Aus der Medizinischen Klinik der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.A. Martini

DIE IMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG DER ALKALISCHEN LEBERPHOSPHATASE IM STUHL UND IHRE KLINISCH-DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG BEIM INTRA- UND EXTRAHEPATISCHEN VERSCHLUSSIKTERUS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

WOLF-RÜDIGER ZENGEL
aus Celle

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.A. Martini

DIE IMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG DER ALKALISCHEN LEBERPHOSPHATASE IM STUHL UND IHRE KLINISCH-DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG BEIM INTRA- UND EXTRAHEPATISCHEN VERSCHLUSSIKTERUS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

WOLF-RÜDIGER ZENGEL
aus Celle

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 22.9.1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. med. F.-G. Lehmann
Correferent: Prof. Dr. med. S. Massarrat

Inhalt

A. Einleitung

1. Definition der alkalischen Phosphatasen 1
2. Struktur und biochemische Reaktionen der alkalischen Phosphatasen 1
3. Physiologische Bedeutung der alkalischen Leber- und Dünndarmphosphatase 1
4. Multiple molekulare Formen der alkalischen Phosphatasen und deren Differenzierung 2

B. Material

1. Reagentien 5
2. Kristalline alkalische Phosphatasen 5
3. Antiseren 6
4. Stuhlproben 6
5. Galle-Pankreas-Sekret 7

C. Methoden

1. Stuhlextraktion 7
2. Gewinnung des sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekrets 7
3. Bestimmung der Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Stuhl 7
4. Bestimmung und Berechnung der Aktivität der alkalischen Leber- und Dünndarmphosphatase im Stuhl und sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret . . . 8
5. Übrige Methoden
5.1. Bestimmung der Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum 9
5.2. Bestimmung der Konzentration des Gesamt-Bilirubin im Serum 1o

D. Ergebnisse

1. Methodische Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivität der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl
1.1. Immunpräzipitation mit Anti-L-AP-γ-Globulin . . . 1o
1.2. Doppelantikörpermethode 11
1.3. PEG-Methode 11

2. Immunologische Verwandschaft der alkalischen Dünndarmphosphatasen des Menschen, des Rindes, der Ratte und der alkalischen Phosphatase aus E. Coli . 12
3. L-AP-Aktivität im Stuhl bei Normalpersonen 16
4. L-AP-Aktivität im Stuhl bei Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom 17
5. D-AP/L-AP-Quotient im Stuhl bei
5.1. Normalpersonen 22
5.2. Pat. mit intrahepatischer Cholestase 22
5.3. Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus 23
6. Lineare Korrelation zwischen D-AP- und L-AP-Aktivität im Stuhl bei
6.1. Normalpersonen 24
6.2. Pat. mit intrahepatischer Cholestase 25
6.3. Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus 26
7. Korrelationsellipsen für
7.1. Normalpersonen und Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom 27
7.2. Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei Leberzirrhose und entzündlichen Lebererkrankungen . . . 28
7.3. Pat. mit akuter Hepatitis und extrahepatischem Verschlußikterus 28
8. Verlaufsbeobachtungen bei Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus 29
9. Verhältnis von L-AP-Aktivität im Stuhl zu Gesamt-Bilirubin-Konzentration im Serum bei
9.1. Pat. mit intrahepatischer Cholestase 34
9.2. Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus 35
1o. Verhältnis von L-AP-Aktivität im Stuhl zur Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum bei
1o.1. Pat. mit intrahepatischer Cholestase 35
1o.2. Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus 37
11. Korrelation zwischen L-AP-Aktivität im Stuhl und sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret 39

E. Diskussion 4o

F. Zusammenfassung 46

G. Literaturverzeichnis 48

A. Einleitung

1. Definition der alkalischen Phosphatasen

Als alkalische Phosphatasen werden alle Enzyme bezeichnet, die die hydrolytische Spaltung von Phosphatestern und den Transfer von Phosphoryl-Gruppen auf ein Akzeptormolekül katalysieren. Alkalische Phosphatasen kommen in multiplen molekularen Formen vor, die in menschlichen Organen in unterschiedlicher qualitativer und quantitativer Verteilung nachgewiesen werden können.

2. Struktur und biochemische Reaktionen der alkalischen Phosphatasen

Der molekulare Aufbau menschlicher alkalischer Phosphatasen ist weitgehend unbekannt. Strukturelle Untersuchungen der alkalischen Phosphatase aus E. coli haben ergeben, daß es sich hierbei um ein zwei identische Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 4oooo daltons umfassendes Dimer handelt (81). Wahrscheinlich ist auch die aktive Form der alkalischen Plazentaphosphatase ein Dimer mit einem Molekulargewicht von 6oooo bis 7oooo daltons pro Untereinheit (12,28,31, 35). Eine definitive Aussage über die Struktur der menschlichen Enzymformen ist derzeit noch nicht möglich. Für die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatasen spielt Zink eine wichtige Rolle. So enthält die alkalische Phosphatase aus E. coli vier Zinkatome, von denen zwei katalytische und zwei strukturelle Bedeutung haben sollen (13,22,35,73,85, 86,9o,91). Über den genauen Mechanismus der Katalyse bestehen verschiedene Modellvorstellungen (14,15,22,48). Neben der P-O-C-Bindung werden im einzelnen folgende Bindungen gespalten: P-F (Fluorophosphat) (17), P-O-P (anorganisches Pyrophosphat) (16), P-S (Cysteamin-S-Phosphat) (67) und P-N (Kreatin-N-Phosphat) (14). Die Transfer-Reaktion erfordert seitens des Akzeptormoleküls die Struktur R-OH, wobei R Wasserstoff oder ein Alkylsubstituent ist wie Glycerol oder Glukose.

3. Physiologische Bedeutung der alkalischen Leber- und Dünndarmphosphatase

Über die physiologischen Funktionen der alkalischen Phospha-

tasen ist wenig bekannt. Entsprechend der Hauptlokalisation des Enzyms in den Zellmembranen verschiedener Organe kann man davon ausgehen, daß die alkalischen Phosphatasen eng einbezogen sind in physiologische Prozesse in oder an der Zellmembran. Die alkalische Dünndarmphosphatase ist offensichtlich wesentlich beteiligt am Mechanismus der Fettabsorption (25,47, 56,58,59). Die Untersuchung menschlicher Lymphe aus dem ductus thoracicus weist eine erhöhte Konzentration des Enzyms nach Einnahme von Fetten auf (27,38,44,45). Während der Fettabsorption nimmt im Dünndarmepithel bei Ratten die Aktivität der Lamina-propria-Phosphatase zu und die der Bürstensaum-Phosphatase ab (82). Das Ausmaß der Aktivitätsänderung ist wahrscheinlich abhängig von der Kettenlänge der Fettsäuren (57). Eine spezielle physiologische Bedeutung der alkalischen Leberphosphatase ist nicht bekannt.

4. Multiple molekulare Formen der alkalischen Phosphatasen und deren Differenzierung

Die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum setzt sich zusammen aus den Einzelaktivitäten der alkalischen Phosphatasen aus Knochen, Leber, Dünndarm, Niere, Plazenta und Leukozyten. Weiterhin besitzen einige maligne Tumoren die Fähigkeit zur Neosynthese einer alkalischen Phosphatase, dem sog. Regan-Isoenzym (23,49), das biochemisch und immunologisch mit der alkalischen Phosphatase aus Plazenta identisch ist. In wieweit dieser Polymorphismus auf das Vorkommen multipler molekularer Formen des Enzymproteins oder aber auf das Vorhandensein echter Isoenzyme, d.h. Enzyme gleicher Substratspezifität bei unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften infolge unterschiedlicher genetisch determinierter Primärstruktur (Aminosäuresequenz) zurückzuführen ist, ist nicht endgültig geklärt (6o). Mit Sicherheit besteht eine enge immunologische Verwandschaft zwischen menschlicher alkalischer Dünndarm- und Plazentaphosphatase, die sich in einer partiellen Kreuzreaktion zeigt (5o). Möglicherweise haben beide Formen eine gemeinsame Untereinheit und sind deshalb echte Isoenzyme. Dieselbe immunologische Verwandschaft besteht unter Umständen zwischen alkalischer Nieren-, Leber- und Knochenphosphatase, die somit ein zweites immunologisch

erkennbares Isoenzymsystem darstellen würden.

Eine Differenzierung der alkalischen Phosphatasen ist durch biochemische, physikalische und immunologische Techniken möglich. Als organspezifische Inhibitoren, d.h. Substanzen, die die Aktivität der alkalischen Phosphatase eines bestimmten Organs hemmen, fanden L-Phenylalanin, L-Homoarginin, L-Tryptophan, L-Leucin, Imidazol und Levamisol Anwendung. So wird menschliche alkalische Plazentaphosphatase durch L-Tryptophan (54), L-Phenylalanin (1o) sowie L-Leucin (66,68) und menschliche alkalische Knochen- und Leberphosphatase durch L-Homoarginin (24,46), Imidazol (7) und Levamisol (3) gehemmt. Zwei Formen alkalischer Dünndarmphosphatase können unterschieden werden, von denen die eine durch L-Phenylalanin (Bürstensaum-Phosphatase), die andere durch L-Homoarginin (Lamina-propria-Phosphatase) gehemmt wird (29,3o,11o). Diese Hemmungsreaktionen sind stereospezifisch (nur das L-Isomer ist aktiver Inhibitor) und nichtkompetetiv.

Die alkalischen Phosphatasen unterscheiden sich in Abhängigkeit von ihrem Organursprung durch eine oder mehrere physikalische Eigenschaften voneinander. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Thermostabilität können durch Hitzeinaktivierung die alkalischen Phosphatasen aus Knochen, Leber, Dünndarm und Plazenta semiquantitativ getrennt werden (22,65). Praktische Bedeutung hat die Hitzeinaktivierung besonders für die Differenzierung von Phenotypen der alkalischen Plazentaphosphatase, die sich durch eine hohe Hitzestabilität auszeichnen (4,1oo).
Eine selektive Denaturierung erlaubt auch die Anwendung von Harnsäure, wobei man mit zunehmender Konzentration eine Inaktivierung in der Reihenfolge alkalische Knochen-, Nieren-, Leber-, Dünndarm-, Plazentaphosphatase erreicht (8,6,9,1).

Für die Trennung alkalischer Phosphatasen durch elektrophoretische Wanderung steht eine Vielzahl von Trägermedien zur Verfügung. So gelang auf einer Stärkegel-Matrix die Trennung alkalischer Phosphatasen aus Plazenta sowie die Phenotypisierung des Regan-Isoenzyms (3,39); das Nagao-Isoenzym wurde mit Hilfe der Agargel-Chromatographie gefunden (68,69). Für die Differenzierung menschlicher alkalischer

Phosphatasen aus Leber, Knochen und Dünndarm hat sich die Polyacrylamidgel-Elektrophorese, insbesondere in der vereinfachten Methodik der Disc-Elektrophorese, bewährt (12,41,32, 92,1o5); verschiedene Untersucher benutzten die einfachere Technik der Zelluloseacetat-Elektrophorese (26,78,79).

Die genannten semiquantitativen biochemischen und physikalischen Methoden haben sich klinisch nicht durchsetzen können. In dieser Arbeit wurde deshalb eine enzymimmunologische Bestimmung alkalischer Phosphatasen durch Titration mit präzipitierenden Antikörpern durchgeführt und auf ihre klinische Anwendbarkeit überprüft.

Die enzymimmunologische Differenzierung menschlicher alkalischer Phosphatasen beruht auf der Überlegung, daß sowohl echte, d.h. genetisch determinierte Isoenzyme, als auch differente Enzyme, d.h. unterschiedliche "Individuen" von Enzymen, die durch verschiedene Gene gesteuert werden und in keinem Isoenzymsystem miteinander in Verbindung treten, sich immunologisch durch spezifische Antikörper differenzieren lassen. Antikörper können durch Immunisierung in Tieren mit reinen menschlichen Phosphatasen erhalten werden. Bei Vorhandensein gleicher Oberflächenstrukturen muß durch Absorption der entsprechenden Antiseren mit dem kreuzreagierenden Antigen Monospezifität erreicht werden.

Die im menschlichen Stuhl vorkommenden alkalischen Phosphatasen sind die Dünndarmphosphatase, die Leberphosphatase und Bakterienphosphatasen. Anti-Dünndarmphosphatase-Serum vom Kaninchen kreuzreagiert nur mit menschlicher alkalischer Plazentaphosphatase; nach Absorption mit menschlicher kristalliner Plazentaphosphatase sind die Antikörper monospezifisch für menschliche alkalische Dünndarmphosphatase (53). Anti-Leberphosphatase-Serum reagiert nicht mit menschlicher alkalischer Dünndarmphosphatase (52). Mögliche immunologische Kreuzreaktionen mit Bakterienphosphatasen wurden in dieser Arbeit untersucht (D.2.) und ausgeschlossen.
Aus diesem Grunde konnten mit Hilfe von absorbierter monospezifischer Anti-Dünndarmphosphatase und unabsorbiertem Anti-Leberphosphatase-Serum isoliert die alkalische Dünndarm- und Leberphosphatase im Stuhl untersucht werden.

Wichtigstes Untersuchungsziel war die klinisch-diagnostische Bedeutung der Bestimmung der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl und Galle-Pankreas-Sekret zur Differentialdiagnose zwischen intra- und extrahepatischem Verschlußikterus.

B. Material

1. Reagentien

1.1. Trispuffer pH 7,5 mit 5% Polyäthylenglykol 6ooo

Zur Herstellung des o,o1M Tris(hydroxymethyl)aminomethan- und o,oo2M $MgCl_2$-Puffers wurden 1,21g $C_4H_{11}NO_3$ und o,4o7g $MgCl_2$ (beide Fa. Merck, Darmstadt) mit Aqua dest. gelöst und auf 1l aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit o,1N HCl eingestellt und der Puffer zu 5% mit Polyäthylenglycol 6ooo (Fa. Merck, Darmstadt) versetzt.

1.2. Biochemica-Test-Combination: Alkalische Phosphatase "optimierte Methode" (Fa. Boehringer, Mannheim)

1.3. Biochemica-Test-Combination: Alkalische Phosphatase (Fa. Boehringer, Mannheim)

1.4. Biochemica-Test-Combination: Bilirubin (Fa. Boehringer, Mannheim)

2. Kristalline alkalische Phosphatasen

Kristalline alkalische Phosphatase aus menschlicher Plazenta und menschlichem Dünndarm wurden nach (53), kristalline alkalische Phosphatase aus menschlicher Leber nach (52) von Herrn Prof. F.-G. Lehmann isoliert. Angereicherte alkalische Phosphatase aus Rattendünndarm wurde analog der Methode der Isolierung menschlicher Dünndarmphosphatase (53) gereinigt. Die Dünndarmmucosa von 5 Wistarratten (2oo bis 25og schwer) wurde durch Abschilfern mit einem Objektträger gewonnen (5,2g), im fünffachen Volumen o,25M Saccharose homogenisiert und mit Butanol extrahiert, durch eine 5o%-ige Acetonpräzipitation und eine Anionenaustauscher-Chromatographie über DEAE-Sephadex angereichert.
Kristalline alkalische Dünndarmphosphatase aus Kälberdarm und aus E. coli wurden von Fa. Boehringer, Mannheim bezogen.

3. Antiseren

3.1. Anti-alkalische Dünndarmphosphatase-γ-Globulin (Anti-D-AP-γ-Globulin)

Anti-D-AP-Serum vom Kaninchen wurde zweimal mit Ammoniumsulfat bis 4o% präzipitiert, der Niederschlag gegen o,o1M Trispuffer, pH 7,5, dialysiert und über eine Anionenaustausch-Chromatographie-Säule mit DEAE-Zellulose chromatographiert. Die γ-Globulin-Fraktion, die im wesentlichen IgG-Globulin enthielt, wurde durch Ultrafiltration über eine XM-5o-Membran eingeengt (Fa. Amicon, Osterode/Holland) und mit kristalliner menschlicher alkalischer Plazentaphosphatase über eine CNBr-aktivierte Sepharose-4b-Austauscher-Chromatographie absorbiert. Das erhaltene Anti-D-AP-γ-Globulin war monospezifisch (53).

3.2. Anti-alkalische Leberphosphatase-γ-Globulin (Anti-L-AP-γ-Globulin)

Anti-L-AP-Serum vom Kaninchen wurde mit Ammoniumsulfat zweimal bis 4o% auspräzipitiert, der Niederschlag in o,o1M Trispuffer aufgenommen und gegen diesen Puffer ammoniumsulfatfrei dialysiert (52).

3.3. Übrige Antiseren

Anti-Kälberdünndarm-AP-Serum, Anti-Rattendünndarm-AP-Serum und Antiserum gegen alkalische Phosphatase aus E. coli wurden durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen (51).

Anti-L-AP-γ-Globulin, absorbiertes Anti-D-AP-γ-Globulin, Anti-Kälberdünndarm-AP-Serum, Anti-Rattendünndarm-AP-Serum und Antiserum gegen alkalische Phosphatase aus E. coli wurden von Herrn Prof. F.-G. Lehmann zur Verfügung gestellt.

4. Stuhlproben

Untersucht wurden Stuhlproben von 42 Normalpersonen, d.h. Personen im Alter von über 3o Jahren, bei denen keine Lebererkrankung, gastrointestinale oder endokrinologische Erkrankung vorlag. Außerdem wurden 76 Stuhlproben von 23 Patienten mit extrahepatischem Verschlußikterus, 65 Stuhlproben von 36 Patienten mit intrahepatischer Cholestase sowie 56 Stuhl-

proben von 12 Patienten mit extrahepatischem Verschlußikterus prä- und postoperativ im Verlauf untersucht.

5. Galle-Pankreas-Sekret

Bei 16 Patienten wurde die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret in "L-AP-like"- und D-AP-Aktivität differenziert.

C. Methoden

1. Stuhlextraktion

Ca. o,3g Stuhl wurden mit der doppelten Menge o,9% NaCl-Lösung versetzt und über ca. 3os bei 1o.oooUpM im Ultra-Turrax-Homogenisator (Typ TP 18-1o) homogenisiert, anschließend für 1omin bei 4°C in einer Sorvall-RC 2-B-Kühlzentrifuge bei 4.oooUpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei 4°C aufbewahrt.

2. Gewinnung des sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret

Vor Durchführung der retrograden endoskopischen Cholangio-Pankreaticographie (ERCP) mit dem Olympus-Duodenoskop JF-B2 wurde das Galle-Pankreas-Sekret mit einem Teflonkatheter unmittelbar vor der Papilla Vateri bzw. durch Aufsetzen auf die Papille nach Stimulation mit 1E Sekretin/kg Körpergewicht (Karolinska Institut Stockholm) abgesaugt. Bis zur Bestimmung der AP-Aktivitäten wurde das Galle-Pankreas-Sekret nach Entfernung des Sediments bei 6.ooog bei -2o°C eingefroren.

3. Bestimmung der Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Stuhl

Die Aktivität der alkalischen Phosphatasen im Stuhl wurde mit der Biochemica-Test-Combination "Alkalische Phosphatase, optimierte Methode" der Fa. Boehringer Mannheim bestimmt. Das Prinzip der Bestimmung besteht in der Spaltung von p-Nitrophenylphosphat durch alkalische Phosphatasen in Phosphat und p-Nitrophenol, wobei die pro Zeiteinheit freigesetzte p-Nitrophenol-Menge proportional der Phosphatasenaktivität ist und aufgrund ihrer gelben Farbe bei 4o5nm photometrisch bestimmt werden kann.
Zur Bestimmung der Gesamtaktivität der alkalischen Phos-

phatasen im Stuhl wurde 1 µl Stuhlextrakt mit 299 µl o,o1M Trispuffer, pH 7,5, mit 5% Polyäthylenglycol versetzt und über 1Std bei 25°C im Wasserbad verwahrt, anschließend über 1omin bei 4°C in der Sorvall-Kühlzentrifuge mit 23.ooog zentrifugiert. 2oo µl des Überstands sowie 3ml der Testlösung (1M Diäthanolamin-Puffer, pH 9,8, o,5mM $MgCl_2$, 1omM Natrium-p-Nitrophenylphosphat) wurden im Wasserbad auf 25°C erwärmt, Enzymlösung und Testlösung miteinander vermischt und der Bestimmungsansatz in eine Glasküvette (1cm Schichtdicke) gegeben. Die Aktivitätsmessung im Eppendorf-Photometer erfolgte über eine Dauer von 5min im linearen Bereich der Reaktion.
Die Bestimmung der Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret erfolgte analog mit einer Modifikation: Es wurden unterschiedliche Volumina des unverdünnten Sekrets zwischen 5 und 2oo µl eingesetzt, da bei Verwendung konstanter Volumina die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen nur selten im meßbaren Bereich lag.

4. Bestimmung und Berechnung der Aktivität der alkalischen Leber- und Dünndarmphosphatase im Stuhl und sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret

Zur Bestimmung der Dünndarm- und Leberphosphatase-Aktivität im Stuhl wurden entsprechend dem abgebildeten Pipettierschema jeweils 1 µl Stuhlextrakt mit 298 µl 5% Polyäthylenglycol enthaltendem o,o1M Trispuffer, pH 7,5, versetzt, anschließend zur Bestimmung der L-AP-Aktivität 1 µl Anti-D-AP-γ-Globulin bzw. zur Bestimmung der D-AP-Aktivität 1 µl Anti-L-AP-γ-Globulin dazugegeben.

	Gesamtaktivität	L-AP-Aktivität	D-AP-Aktivität
Stuhlextrakt	1 µl	1 µl	1 µl
Trispuffer	299 µl	298 µl	298 µl
Anti-D-AP-γ-Globulin	-	1 µl	-
Anti-L-AP-γ-Globulin	-	-	1 µl

Tab. I

Das Gemisch wurde über 1Std bei 25°C im Wasserbad inkubiert und das Präzipitat über 1omin bei 4°C in der Sorvall-Kühlzentrifuge bei 23.ooog abzentrifugiert. 2oo µl des Überstands und 3ml der Testlösung wurden nach Erwärmung im Wasserbad auf 25°C miteinander vermischt und die Aktivitätsänderung innerhalb von 5min im linearen Bereich der Reaktion gemessen.
Die Bestimmung der alkalischen Dünndarm- und Leberphosphatase-Aktivität im sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret erfolgte analog bei Einsatz unterschiedlicher Sekretvolumina zwischen 5 und 2oo µl.
Für die Berechnung von Enzymaktivitäten gilt allgemein die

Formel: $A = \Delta E \cdot \frac{1ooo \cdot V}{min \cdot \varepsilon \cdot d \cdot v}$ (mU/ml)

Der Extinktionskoeffizient (ε) von p-Nitrophenol beträgt bei 4o5nm 18,5cm^2/µMol. Die Schichtdicke der Küvette (d) beträgt 1cm, v ist die eingesetzte Stuhlmenge (o,22 µg), V die Summe der im Pipettierschema angegebenen Volumina (3,2ml). Die Messung der Extinktion (E) erfolgte im Abstand von 5min. Durch Einsetzen der Konstanten in die oben genannte Formel folgt für die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im

Stuhl: $A_{ges.-AP} = \Delta E \cdot 155,8o3$ (mU/g Stuhl)

Die Berechnung der Einzelaktivitäten der alkalischen Leber- und Dünndarmphosphatase im Stuhl erfolgte nach den Formeln:

$$A_{L-AP} = (\Delta E_{ges.-AP} - \Delta E_{D-AP}) \cdot 155,8o3 \quad (mU/g\ Stuhl)$$

$$A_{D-AP} = (\Delta E_{ges.-AP} - \Delta E_{L-AP}) \cdot 155,8o3 \quad (mU/g\ Stuhl)$$

Die Berechnung der Gesamtaktivität sowie der Einzelaktivitäten der alkalischen Phosphatasen im sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret erfolgte analog unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Sekretvolumina, die in den Bestimmungsansatz eingingen.

5. Übrige Methoden

5.1. Bestimmung der Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum

Die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum wurde nach Bessey, O.A., Lowry, O.H. und Brock, M.J. (5) bestimmt.

5.2. Bestimmung der Konzentration des Gesamt-Bilirubin im Serum

Die Bestimmung des Gesamt-Bilirubin im Serum erfolgte nach der Methode von Jendrassik, L. und Gróf, P. (4o).

D. Ergebnisse

1. Methodische Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivität der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl

1.1. Immunpräzipitation mit Anti-L-AP-γ-Globulin

Kristalline alkalische Leberphosphatase wird durch ihre Antikörper zu 9o% im Antigen-Antikörper-Äquivalenzbereich auspräzipitiert. Diese 9o%-ige Präzipitation wird mit 5 µl Anti-L-AP-γ-Globulin erreicht; bei weiterer Zugabe des Antikörpers bis zu 2o µl verbleibt die Präzipitation auf einem linearen Niveau; die Zugabe größerer Antikörpermengen führt im Antikörperüberschußbereich zu einer Wiederauflösung der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe und somit zum Auftreten enzymatisch meßbarer Aktivität im Überstand (Abb.1).

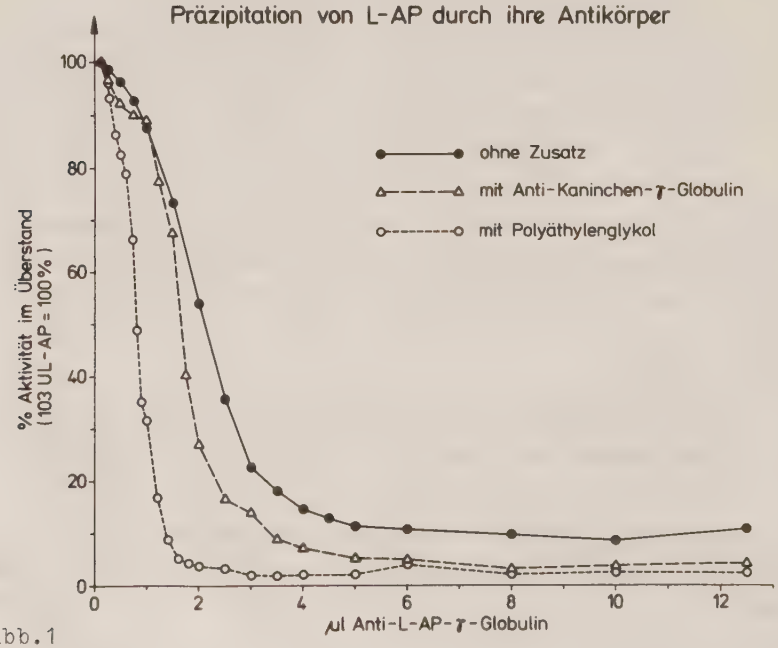

Abb.1

1.2. Doppelantikörpermethode

Bei Anwendung der Doppelantikörpermethode mit Einsatz von Anti-Kaninchen-γ-Globulin von der Ziege als zweitem Antikörper steigt die auspräzipitierte Enzymmenge ab Zusatz von 1,5 μl Antiserum an; die maximale Präzipitation beträgt 97%. Es erfolgt jedoch wiederum im Antikörperüberschußbereich ab Einsatz von 2o μl Antiserum eine Wiederauflösung der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe mit Anstieg freier im Überstand meßbarer enzymatischer Aktivität (Abb.1).

1.3. PEG-Methode

In Anwesenheit von Polyäthylenglycol (PEG-Methode) zeigt die Präzipitationskurve demgegenüber eine wesentlich frühere Präzipitation von alkalischer Leberphosphatase durch ihre Antikörper. Der Zusatz von 1,5 μl Anti-L-AP-γ-Globulin bewirkt eine maximale Präzipitation; in einem Bereich bis zu 1oo μl Anti-L-AP-γ-Globulin-Zusatz kommt es zu keiner Wiederauflösung der entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe (Abb.1).

Die PEG-Methode erweist sich somit der Doppelantikörpermethode sowie der Messung durch Immunpräzipitation ohne Zusatz

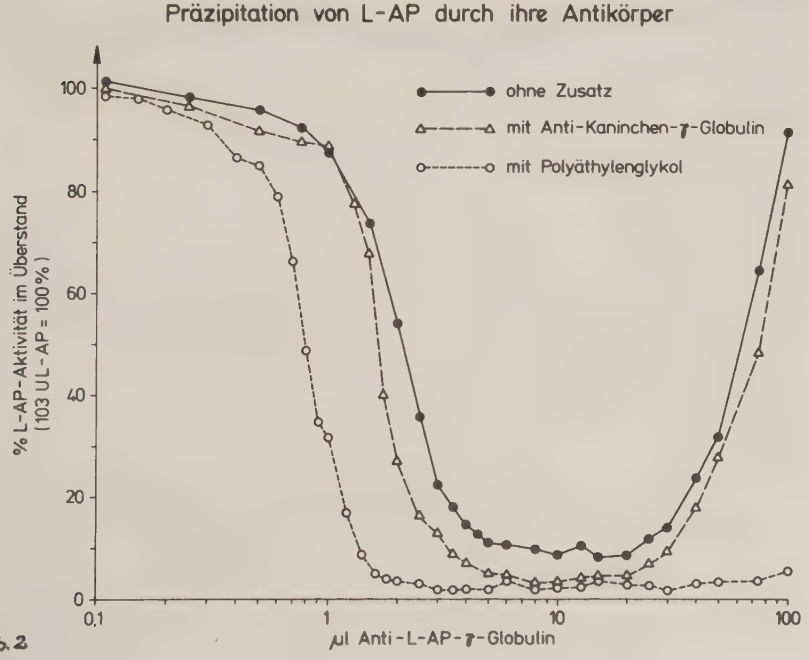

Abb. 2

deutlich überlegen. Es kommt insbesondere zu keiner Wiederauflösung gebildeter Antigen-Antikörper-Komplexe und folglich zu einer zuverlässigen Messung bei Zusatz zwischen 1,5 und 1oo µl Anti-L-AP-γ-Globulin. Im niedrigen Antikörperüberschußbereich sind die Doppelantikörpermethode und die PEG-Methode praktisch gleichwertig, wenn man davon absieht, daß etwa die dreifache Menge von Antikörpern für die Doppelantikörpermethode zur vollständigen Präzipitation der alkalischen Leberphosphatase benötigt wird (Abb.2).

2. Immunologische Verwandschaft der alkalischen Dünndarmphosphatasen des Menschen, des Rindes, der Ratte und der alkalischen Phosphatase aus E. coli

Kristalline alkalische Dünndarmphosphatase des Menschen wird durch Anti-Humandünndarm-AP vollständig auspräzipitiert (Abb.3). 1 µl Antiserum bewirkt eine 9o%-ige Präzipitation des homologen Antigens; bei Einsatz von 2,5 µl Antiserum oder mehr kommt es zu einer Präzipitation von über 96% der eingesetzten Enzymaktivität. Demgegenüber wird eine Präzipitation von 9o% der eingesetzten Enzymmenge durch Anti-Kälberdünndarm-

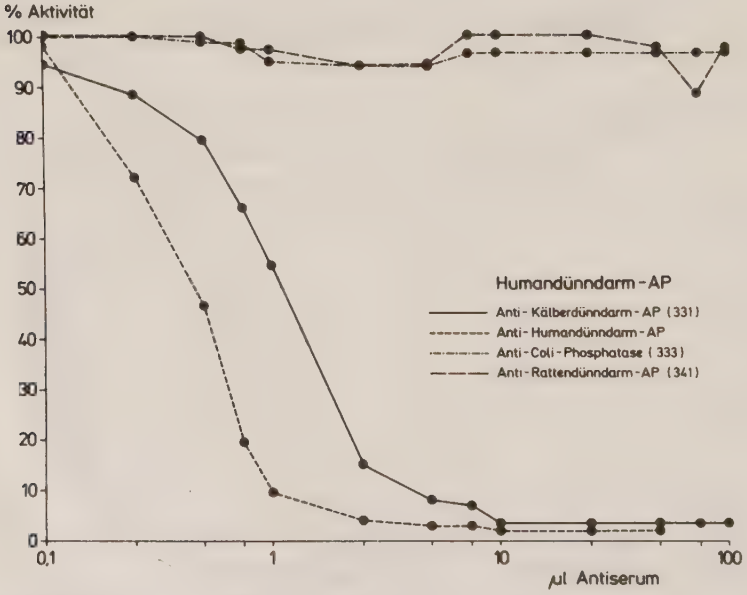

Abb.3

AP-Serum erst durch 5 µl Antiserum erreicht; vollständige Präzipitation kann mit Einsatz von 1o µl Anti-Kälber-Dünndarm-AP-Serum erzielt werden. Eine Lösung der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe im Antikörperüberschußbereich wird bis zu einem Zusatz von 1oo µl Antiserum nicht beobachtet. Der Einsatz von Anti-Rattendünndarm-AP-Serum oder Anti-E.coli-AP-serum führt zu keiner Präzipitation des heterologen menschlichen Enzyms.

Analoge Ergebnisse erhält man mit kristalliner alkalischer Phosphatase, die aus Kälberdünndarm isoliert wurde (Abb.4). Die mit Abstand beste Präzipitation wird mit dem homologen Antiserum erzielt (maximale Präzipitation mit o,2 µl). Auch Anti-Humandünndarm-AP-Serum vermag in einem 5o-fachen Überschuß im Vergleich zum homologen Antiserum eine vollständige Präzipitation des Kälberdünndarmenzyms herbeizuführen. Während die Antikörper gegen die entwicklungsgeschichtlich weit entfernte alkalische Phosphatase aus E. coli auch mit alkalischer Kälberdünndarmphosphatase keinerlei Reaktionen zeigen, kann mit großen Mengen Anti-Rattendünndarm-AP-Serum noch eine Präzipitation erreicht werden: 1o µl Anti-Ratten-

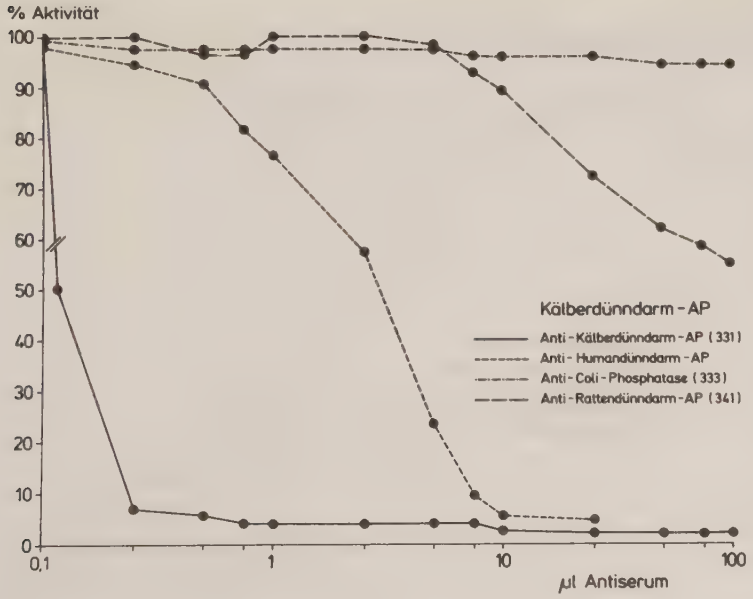

Abb.4

dünndarm-AP-Serum präzipieren ca. 1o%, 1oo µl ca. 45% der eingesetzten alkalischen Kälberdünndarmphosphatase. Ähnlich sind die Verhältnisse bei der Immuntitration angereicherter alkalischer Phosphatase aus Rattendünndarm. Die Präzipitation gelingt am besten mit dem homologen Antiserum, gefolgt von den Antikörpern gegen die entwicklungsgeschichtlich am nächsten liegende alkalische Phosphatase aus Kälberdünndarm. Die Reaktion mit Antikörpern gegen menschliche alkalische Dünndarmphosphatase ist gering; Antikörper gegen alkalische Phosphatase aus E. coli reagieren nicht (Abb.5). Untersuchungen der Immunpräzipitation von kristalliner alkalischer Phosphatase aus E. coli bestätigen diese Ergebnisse: eine gute Präzipitation wird durch die homologen Antikörper erzielt, während die Antikörper gegen die animalischen Phosphatasen keine wesentliche Reaktion mit dem Bakterienenzym zeigen (Abb.6). Die geringe nach Zentrifugation im Überstand meßbare enzymatische Aktivität bei Zusatz von Antikörpern gegen Ratten-, Kälber- und Humandünndarm-AP könnte auf eine minimale Kreuzreaktion der Antikörper der animalischen Phosphatasen mit alkalischer Phosphatase aus E. coli zurückzu-

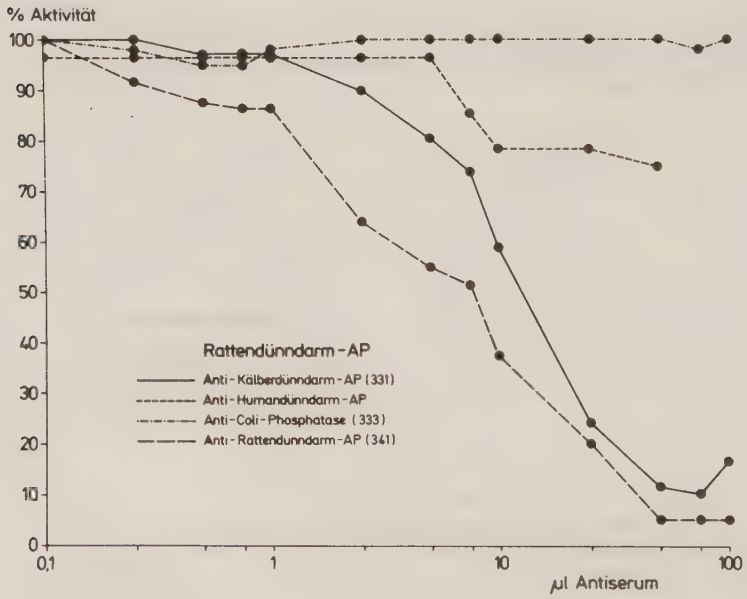

Abb.5

führen sein. Der fehlende Nachweis im umgekehrten System (Antikörper gegen alkalische Phosphatase aus E. coli zeigen keine Reaktion mit den kristallinen animalischen Enzymen) läßt jedoch eher vermuten, daß es sich bei diesen Veränderungen der Kurven im Antikörperüberschußbereich um Artefakte handelt. Der kontinuierlich langsam absteigende Verlauf der Kurven spricht gegen eine Verunreinigung der animalischen Enzyme durch Bakterien, die alkalische Phosphatasen mit Kreuzreaktion gegen alkalische Phosphatase aus E. coli besitzen könnten; in diesem Falle wäre ein scharfer Abfall der präzipitierbaren Aktivität in der Menge des verunreinigenden Enzyms mit anschließend linearem geradlinigem Verlauf der Kurve zu erwarten.

Im homologen System, d.h. bei Immunpräzipitation eines Enzyms mit spezifischen Antiseren gegen dieses Enzym, beobachtet man in der Regel einen gleichsinnigen Verlauf der Präzipitationskurven bei Anwendung unterschiedlicher spezifischer Antiseren: als Beispiel ist in Abb.7 die Präzipitation alkalischer Phosphatase aus E. coli mit Antiseren verschiedener Kaninchenchargen (333,334) dargestellt.

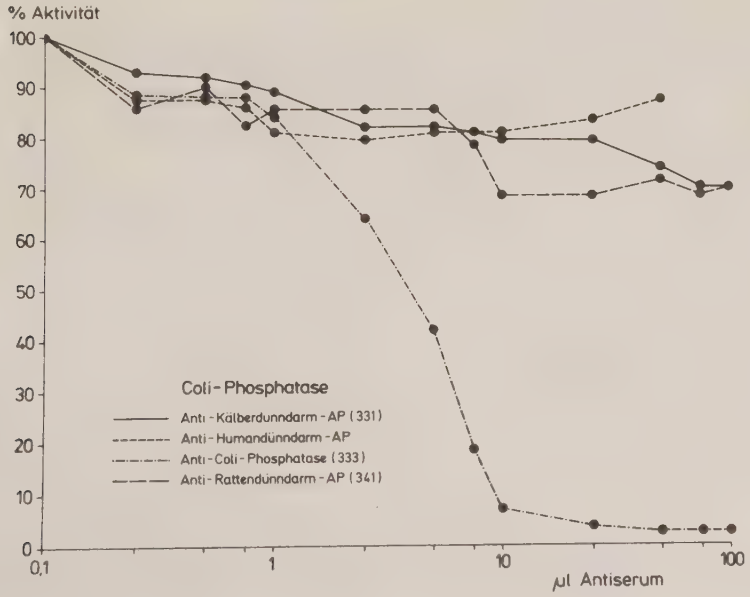

Abb.6

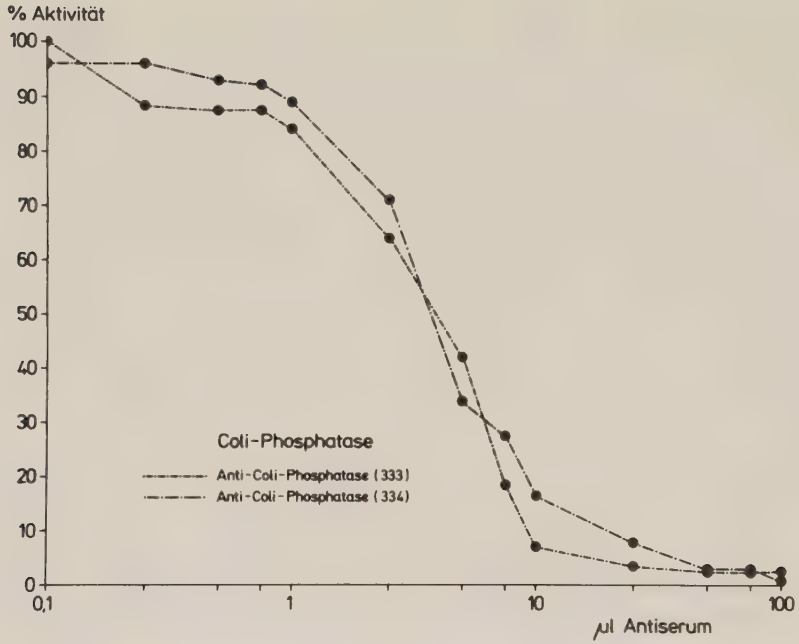

Abb.7

3. L-AP-Aktivität im Stuhl bei Normalpersonen

Die Summenhäufigkeitskurve der L-AP-Aktivität im Stuhl von Normalpersonen zeigt eine logarithmische Normalverteilung (Abb.8). Der sigmoidförmige Verlauf der Summenhäufigkeitskurve im logarithmischen Maßstab entspricht der bekannteren glockenförmigen Normalverteilungskurve (Gauß'sche Kurve) im linearen Maßstab. Die Darstellung der Summenhäufigkeitskurve wurde gewählt, um die Willkürlichkeit der Klasseneinteilung bei kleinen Stichproben zu umgehen.
Das arithmetische Mittel der L-AP-Aktivität im Stuhl bei 42 Normalpersonen beträgt $\bar{x}$ = 3,73 log U_{L-AP}/g Stuhl. Die einfache Streuung beträgt o,44 log U_{L-AP}/g Stuhl. Sämtliche L-AP-Aktivitäten im Stuhl der 42 Normalpersonen liegen im 99% Wahrscheinlichkeitsbereich (2,57s). Der annähernd ideale Verlauf der Summenhäufigkeitskurve bei einer kleinen Stichprobe zeigt, daß die Variation der L-AP-Aktivität im Stuhl bei Normalpersonen unter Berücksichtigung der Transformation der gemessenen Aktivitäten in den logarithmischen Maßstab gering

ist. Dem entspricht im linearen Maßstab, der normalerweise in der klinisch-chemischen Diagnostik Verwendung findet, eine breite Streuung der bei Normalpersonen gemessenen Enzymaktivitäten von 779 bis 58893 mU/g Stuhl (Abb.9). Das arithmetische Mittel der L-AP-Aktivitäten beträgt bei Normalpersonen $\bar{x}$ = 5315 mU/g Stuhl, der 2s-Streubereich reicht von 748 bis 38207 mU_{L-AP}/g Stuhl.

4. L-AP-Aktivität im Stuhl bei Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom

Gegenüber den 42 Normalpersonen zeigen 36 Pat. mit intrahepatischer Cholestase eine Erhöhung der L-AP-Aktivität im Stuhl um ca. 20% und 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus eine Reduktion um ca. 33%. Das arithmetische Mittel der gemessenen Enzymaktivitäten beträgt bei den 36 Pat. mit intrahepatischer Cholestase $\bar{x}$ = 6132 mU_{L-AP}/g Stuhl, bei den 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus $\bar{x}$ = 3549 mU_{L-AP} pro g Stuhl. 20 von 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus zeigen L-AP-Aktivitäten im Stuhl unterhalb des arithmetischen Mittels für Normalpersonen (Abb.9).

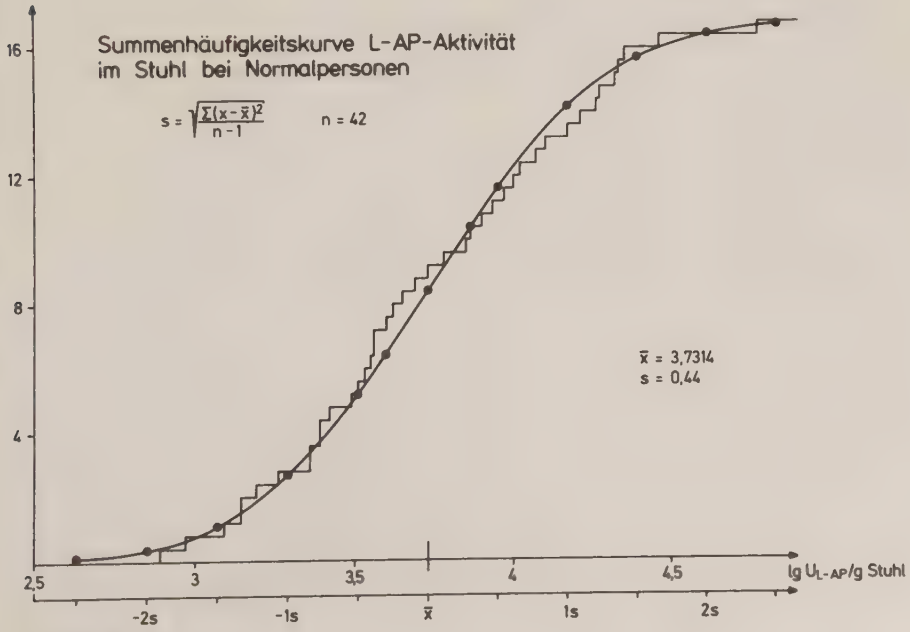

Abb.8

L-AP-Aktivität im Stuhl bei Normalpersonen und Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußikterus

D-AP/L-AP-Aktivität im Stuhl

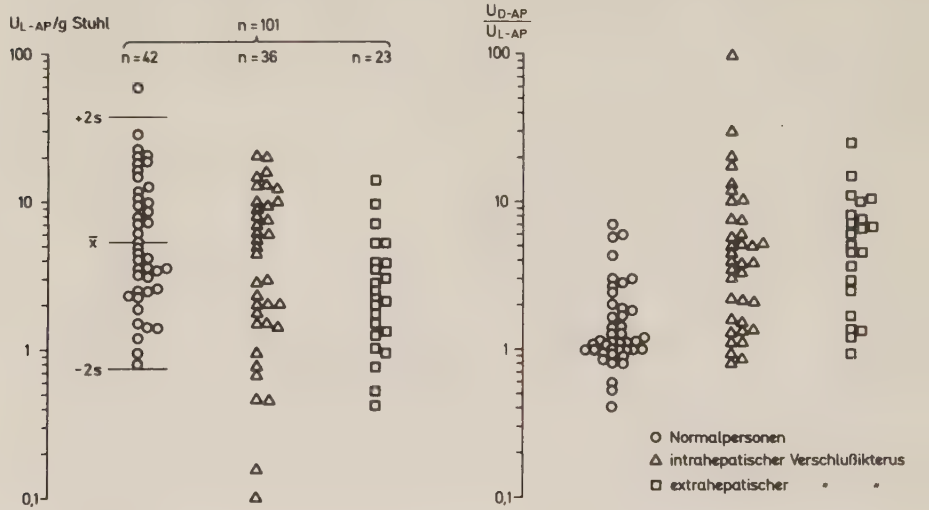

Abb.9

Die zum Verständnis der Aktivitätsverteilung bei Pat. mit intrahepatischer Cholestase notwendige Aufschlüssenung des Gesamtkollektivs ergibt, daß 13 Pat. eine HB_s-Antigen-pos. bzw. HB_s-Antigen-neg. Hepatitis, 13 Pat. eine intrahepatische Cholestase bei Leberzirrhose, 5 Pat. ein intrahepatisches Verschlußsyndrom bei Alkoholhepatitis (Fettleberhepatitis), 2 Pat. einen malignen intrahepatischen Verschluß und je 1 Pat. ein intrahepatisches Verschlußsyndrom bei multiplen Leberabszessen, bei Hämosiderose der Leber mit zusätzlicher hämolytischer Anämie sowie bei einer arzneimittelbedingten Cholestase (Ajmalin) aufweisen (Abb.1o). Aus dieser Aufgliederung wird ersichtlich, daß die L-AP-Aktivität im Stuhl bei Pat. mit endzündlichen Lebererkrankungen (Hepatitiden) und/oder Alkoholhepatitis in einem deutlich höheren Bereich liegt als bei Pat. mit Leberzirrhose. Das arithmetische Mittel der L-AP-Aktivität bei 13 Pat. mit HB_s-Antigen-positiver bzw. negativer Hepatitis beträgt $\bar{x}$ = 9143 mU/g Stuhl, bei 5 Pat. mit Alkoholhepatitis $\bar{x}$ = 84o2 mU/g Stuhl und demgegenüber bei 13 Pat. mit Leberzirrhose $\bar{x}$ = 3477 mU/g Stuhl.

Die bei Leberzirrhose deutlich niedrigeren L-AP-Aktivitäten im Stuhl im Vergleich zu den anderen Übersichtsgruppen sind möglicherweise durch eine Synthese- und/oder Ausscheidungsstörung bei diesem Krankheitsbild bedingt. Insgesamt zeigen 11 von 13 Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei akuter Hepatitis (84,6%), 3 von 13 Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei Leberzirrhose (23,1%), 3 von 5 Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei Alkoholhepatitis (6o%) und 2 von 5 Pat. mit intrahepatischem Verschlußsyndrom aus anderer Ursache (4o%) eine L-AP-Aktivität über 3ooo mU/g Stuhl.

Bei 7 von 36 Pat. mit intrahepatischer Cholestase (4 Pat. mit HB_S-Antigen-pos., 2 Pat. mit HB_S-Antigen-neg. Hepatitis, 1 Pat. mit endzündlicher Lebererkrankung aus anderer Ursache) konnten die zeitlichen Zusammenhänge zwischen Beginn und Dauer des Ikterus, Maximum des Bilirubinanstiegs im Serum,

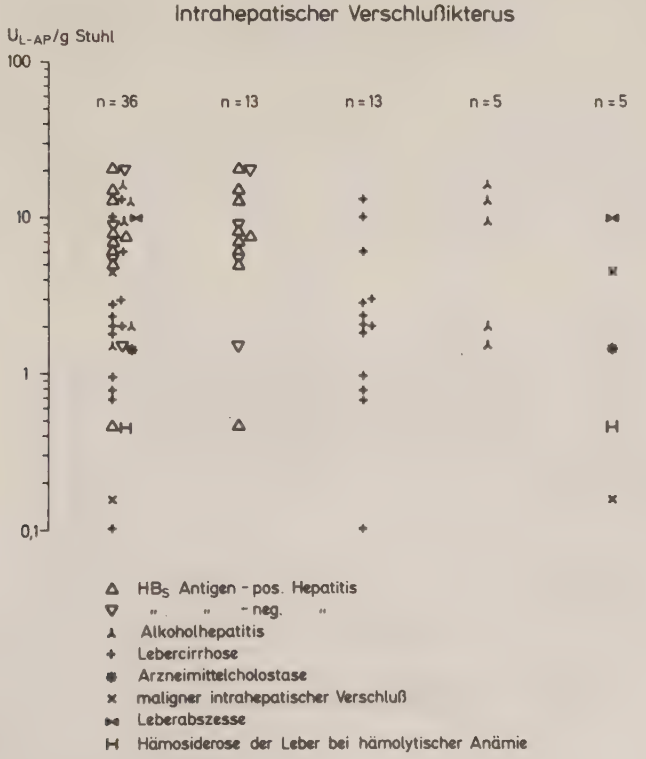

Abb.1o

Maximum der Transaminasenaktivität im Serum und der L-AP-Aktivität im Stuhl untersucht werden (Tab.II). Bei der relativ geringen Patientenzahl - Kontrolluntersuchungen bei demselben Pat. konnten nur in 3 Fällen durchgeführt werden - läßt sich eine gesicherte Beziehung zwischen diesen Daten nicht finden. Weitere Untersuchungen an einem größeren Krankengut mit intrahepatischer Cholestase bei akuter Virushepatitis müssen diese Frage klären.

Die Aufgliederung des Gesamtkollektivs der 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus ergibt 7 Pat. mit malignem Choledochusverschluß, 5 Pat. mit benignem Gallengangsverschluß (Choledocholithiasis ausgeschlossen) und 11 Pat. mit Choledocholithiasis (Abb.11). Unter den Pat. mit malignem Choledochusverschluß zeigten 3 Pat. einen kompletten, 2 Pat. einen partiellen Verschluß und 2 Pat. eine weitgehend erhaltene Durchgängigkeit der Gallenwege bei der retrograden Cholangiographie. Bei den Pat. mit benignem Choledochusverschluß lag in 2 Fällen eine nur geringgradige Abflußbehinderung vor, in 2 Fällen war der Verschluß partiell, in 1 Fall komplett. Dagegen zeigten 9 Pat. mit Choledocholithiasis eine weitgehend erhaltene Durchgängigkeit der Gallenwege zum Zeitpunkt der retrograden Cholangiographie, 2 Pat. hatten einen inkompletten Verschluß des Ductus Choledochus.

Pat.	Diagnose	Beginn des Ikterus	Maximum der Bilirubin-konzentration	Maximum der Transaminasen-aktivität	L-AP-Aktivität (mU/g Stuhl)
		(Tage vor (-) bzw. nach (+) Bestimmung der L-AP-Aktivität im Stuhl)			
S.,E.	HB_s-Antigen-pos. Hepatitis	-2o	-11	-12	467,4
B.,H.		-17	- 3	- 8	4674,1
H.,H.		-31	-17	-17	6o76,3
K.,A.		-12	- 5	+13	8257,4
		-15	- 8	+1o	5298,3
K.,M.	HB_s-Antigen-neg. Hepatitis	- 8	- 4	+ 7	7634,4
D.,B.		-18	+29	+1o	21345,o
		-3o	+17	- 2	6o76,3
		-31	+16	- 3	5453,1
		-32	+15	- 4	9348,2
S.,E.	Hepatitis aus anderer Ursache	-11	- 2	- 3	1558,o

Tab.II

Die in allen 3 Patientengruppen mit extrahepatischem Verschlußikterus gemessenen L-AP-Aktivitäten im Stuhl unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Das arithmetische Mittel der Enzymaktivitäten in der Gruppe mit malignem Verschluß beträgt $\bar{x}$ = 3394 (n = 7), das der Gruppe mit benignem Verschluß $\bar{x}$ = 2616 (n = 5) und das der Gruppe mit Choledocholithiasis $\bar{x}$ = 3549 mU_{L-AP}/g Stuhl (n = 11). 15 von 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus zeigen bei der ersten Bestimmung eine Enzymaktivität unter 3ooo mU_{L-AP}/g Stuhl, 5 von 6 Pat. mit vollständigem extrahepatischem Verschluß und 2 von 4 Pat. mit partiellem Gallengangsverschluß zeigen ebenfalls eine Enzymaktivität unter 3ooo mU_{L-AP}/g Stuhl.

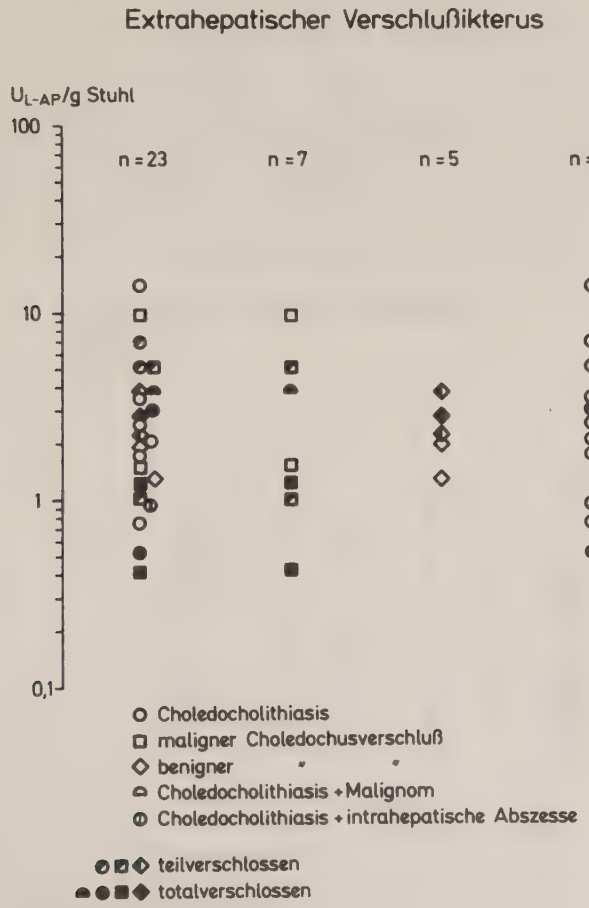

Abb.11

5. D-AP/L-AP-Quotient im Stuhl

5.1. Normalpersonen

Die Berechnung des D-AP/L-AP-Quotienten im Stuhl zum Ausschluß eines variablen Verdünnungsfaktors bei unterschiedlicher Stuhlmenge und/oder Stuhlkonsistenz ergibt bei Normalpersonen Werte zwischen o,4 und 7 (Abb.9). In diesem Kollektiv werden vorwiegend höhere D-AP- als L-AP-Aktivitäten im Stuhl gemessen. Der Streubereich des D-AP/L-AP-Quotienten im Stuhl bei Normalpersonen ist deutlich geringer als der Streubereich der L-AP-Aktivität.

5.2. Pat. mit intrahepatischer Cholestase

Im Vergleich zu den 42 Normalpersonen findet man bei Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom eine deutliche Erhöhung des D-AP/L-AP-Quotienten im Stuhl (Abb.9). Die Aufschlüsselung des Gesamtkollektivs der Pat. mit intrahepatischer Cholestase zeigt einen gegenüber den Normalpersonen nur gering erhöhten D-AP/L-AP-Quotienten bei Pat. mit endzündlichen Lebererkrankungen und einen deutlich erhöhten Quotienten bei Pat. mit Leberzirrhose (Abb.12). Die D-AP-Aktivität

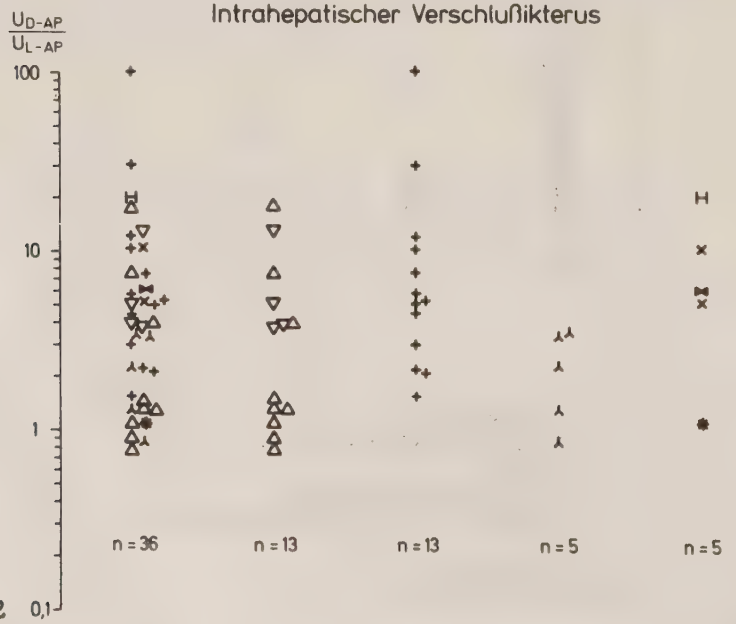

Abb.12

im Stuhl liegt bei allen Pat. mit intrahepatischer Cholestase im gleichen Bereich. Aus diesen beiden Ergebnissen wird ersichtlich, daß die deutlich unterschiedlichen L-AP-Aktivitäten bei Pat. mit endzündlichen Lebererkrankungen und Leberzirrhose nicht auf methodische Fehler oder Rechnungsfehler durch unterschiedliche Verdünnungsfaktoren im Stuhl zurückzuführen sind.

5.3. Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus

Beim extrahepatischen Verschlußikterus zeigt sich ähnlich wie bei intrahepatischer Cholestase eine deutliche Erhöhung des D-AP/L-AP-Quotienten im Stuhl gegenüber den Normalpersonen (Abb.9). Die Aufgliederung der 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus in Pat. mit malignem und benignem Verschluß, Choledocholithiasis und extrahepatischen Verschluß aus anderer Ursache zeigt keine signifikanten Unterschiede des D-AP/L-AP-Quotienten in den einzelnen untersuchten Gruppen (Abb.13). Auch eine Aufschlüsselung der Pat. in Kranke mit weitgehend erhaltener Durchgängigkeit der Gallenwege (nachgewiesen durch die retrograde Cholangiographie zum Zeitpunkt der L-AP-Akti-

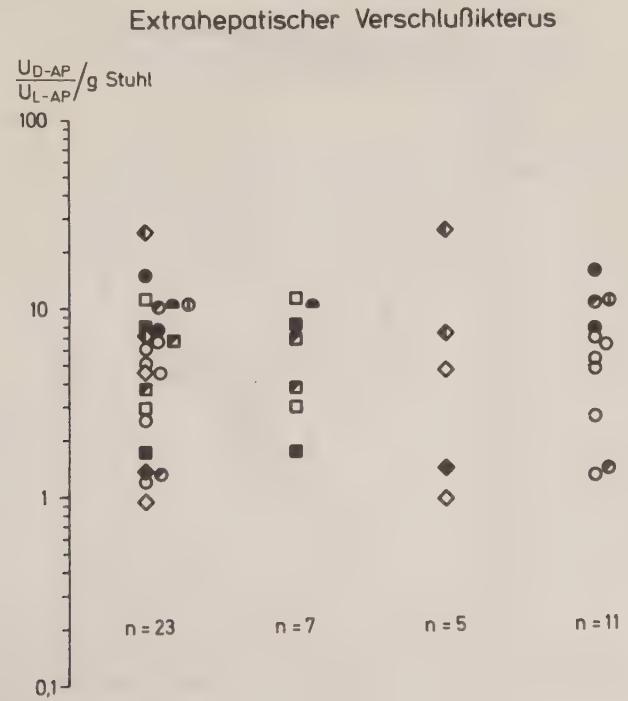

Abb.13

vitätsbestimmung im Stuhl), in Kranke mit partiellem und Kranke mit vollständigem extrahepatischem Verschluß läßt keine wesentlichen Unterschiede im D-AP/L-AP-Quotienten erkennen. Diese Ergebnisse entsprechen ebenfalls den in den einzelnen Gruppen gemessenen L-AP-Aktivitäten. Folglich können variable Verdünnungsfaktoren bei unterschiedlicher Stuhlmenge und/oder Stuhlkonsistenz die differenten L-AP-Aktivitäten im Stuhl von Normalpersonen und Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom nicht erklären.

6. Lineare Korrelation zwischen D-AP- und L-AP-Aktivität im Stuhl

6.1. Normalpersonen

Zwischen der D-AP- und L-AP-Aktivität im Stuhl von 42 Normalpersonen besteht eine deutlich lineare Korrelation mit einem engen Streubereich um eine durch den Schnittpunkt der Koordinaten laufende Gerade mit dem Steigungsfaktor 1 (Abb.14). Dieses weist auf eine Abhängigkeit der gemessenen Enzymaktivitäten von der Konsistenz und/oder Menge der Stuhlproben hin:

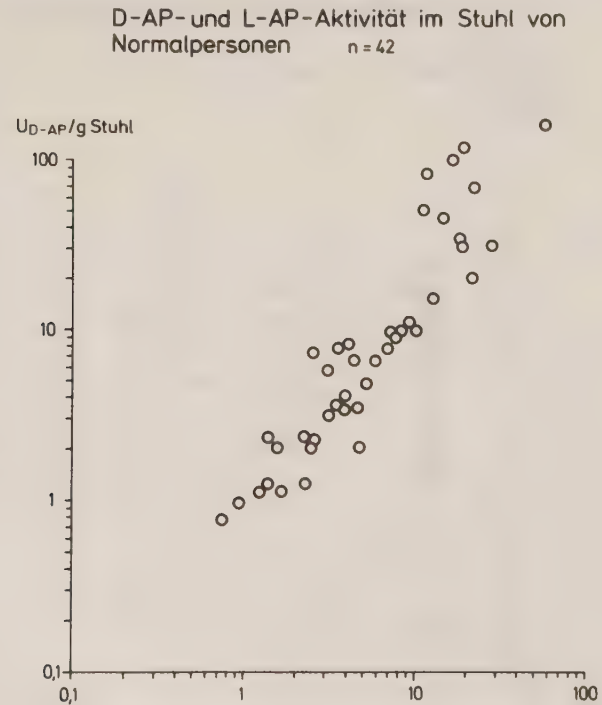

Abb.14

zunehmende Stuhlmenge und flussigere Stuhlkonsistenz bewirken eine gleichgerichtete Aktivitätsverminderung beider Enzyme im Stuhl. Zu einem entsprechenden Ergebnis führte der Vergleich zwischen gemessener L-AP-Aktivität und errechnetem D-AP/L-AP-Quotienten im Stuhl von Normalpersonen, wo nach Eleminierung des Verdünnungsfaktors durch Bildung eines Quotienten eine Konzentration der Normalwerte in einem engeren Bereich erfolgte.

6.2. Pat. mit intrahepatischer Cholestase

Die lineare Korrelation der D-AP- und L-AP-Aktivität bei 59 Bestimmungen von 36 Pat. mit intrahepatischer Cholestase zeigt gegenüber Normalpersonen eine Parallelverschiebung der zu berechnenden Korrelationsgeraden im Sinne einer Verminderung der L-AP-Aktivität bei gleichbleibender D-AP-Aktivität im Stuhl sowie eine zunehmende Streuung der Meßwerte (Abb.15). Ein Vergleich der Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei Leberzirrhose und entzündlichen Lebererkrankungen ergibt eine deutliche Aktivitätsverminderung der L-AP und eine geringere

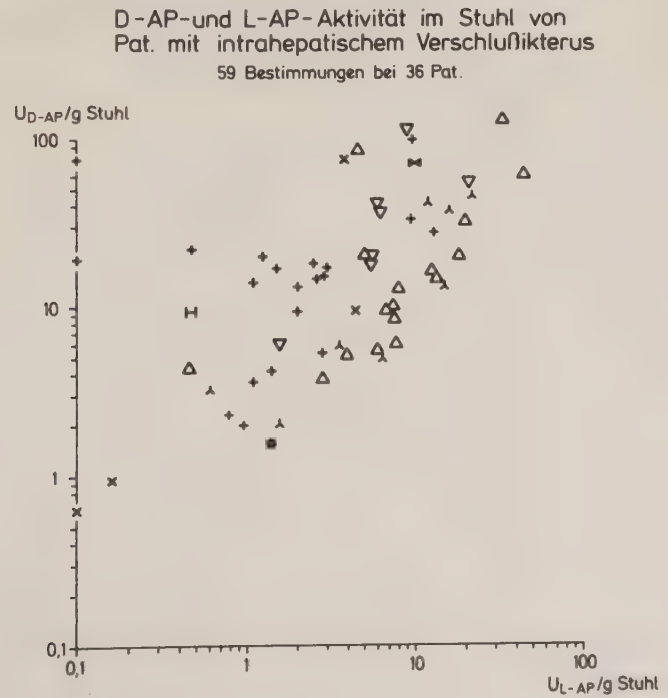

Abb.15

Verminderung der D-AP-Aktivität bei Pat. mit Leberzirrhose.

6.3. Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus

Eine weitere Parallelverschiebung der zu berechnenden Korrelationsgeraden im Sinne einer Verminderung der L-AP-Aktivität im Stuhl gegenüber Normalpersonen bei zunehmender Streuung der Meßwerte zeigt die lineare Korrelation von L-AP- und D-AP-Aktivität im Stuhl bei 46 Bestimmungen von 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus (Abb.16). Pat. mit partiellem oder totalem Verschluß zeigen im Vergleich zu Pat. mit weitgehend erhaltener Durchgängigkeit der Gallenwege deutlich niedrigere L-AP-Aktivitäten im Stuhl, wobei die L-AP-Aktivitäten in einem engeren Bereich schwanken als die D-AP-Aktivitäten. Ein Unterschied zwischen den Patientengruppen mit benignem bzw. malignem bzw. allein durch Steinverschluß hervorgerufenem extrahepatischem Verschlußikterus ist in der linearen Korrelation von L-AP- und D-AP-Aktivität im Stuhl erwartungsgemäß nicht erkennbar.

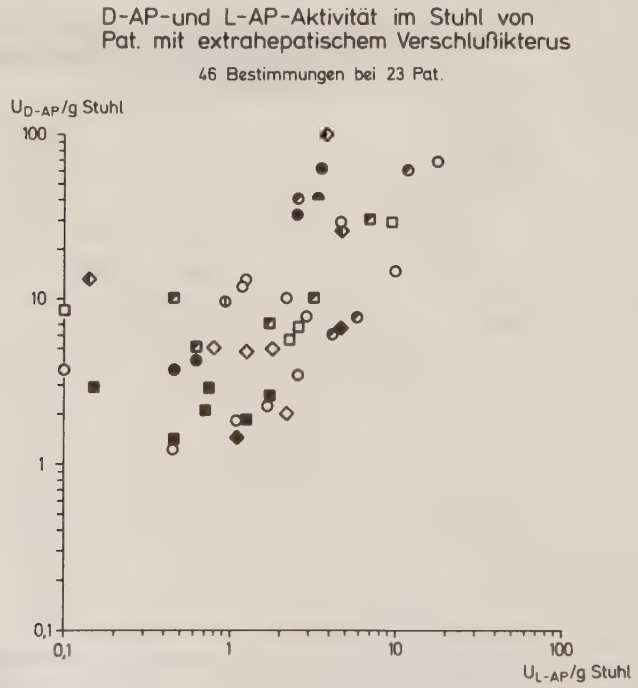

Abb.16

7. Korrelationsellipsen

7.1. Normalpersonen und Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom

Die Korrelationsellipsen wurden aus den L-AP- und D-AP-Aktivitäten im Stuhl von 42 Bestimmungen bei 42 Normalpersonen, 59 Besrimmungen bei 36 Pat. mit intra- und 46 Bestimmungen bei 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußsyndrom unter Annahme eines Konfidenzintervalls von 95% errechnet. Von der engen und schmalen Korrelationsellipse für die Normalpersonen heben sich die Korrelationsellipsen für die Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußikterus deutlich ab (Abb.17). Die überwiegende Anzahl der Bestimmungen bei Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom liegt außerhalb der 95%-Wahrscheinlichkeitsgrenze der Meßwerte von Normalpersonen. Die Korrelatiosellipsen für die Gesamtkollektive der Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußikterus zeigen einen breiten Überlappungsbereich.

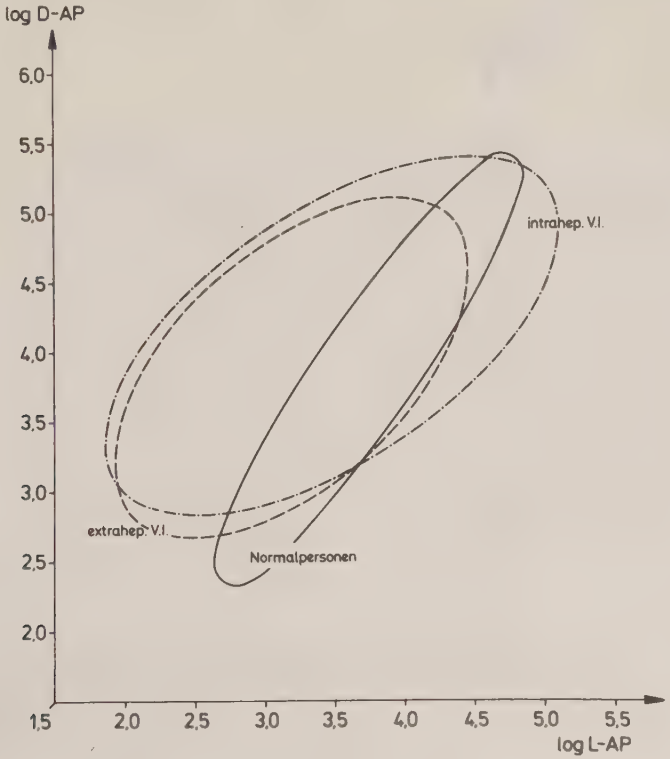

Abb.17

7.2. Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei Leberzirrhose und entzündlichen Lebererkrankungen

Wie aus Abb.1o,12 und 15 hervorgeht, besteht ein deutlicher Unterschied in der L-AP-Aktivität im Stuhl bei Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei akuter Leberentzündung und bei Leberzirrhose. Dementsprechend erhält man bei gleicher Aufschlüsselung des Gesamtkollektivs der Pat. mit intrahepatischer Cholestase deutlich differente Korrelationsellipsen für Pat. mit akuter Hepatitis und Leberzirrhose (Abb.18).

7.3. Pat. mit akuter Hepatitis und extrahepatischem Verschlußikterus

Während die Korrelationsellipse der Pat. mit Leberzirrhose breit die Korrelationsellipse der Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus überlappt, weichen die Korrelationsellipsen von Pat. mit akuter Hepatitis und Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus deutlich voneinander ab (Abb.19).

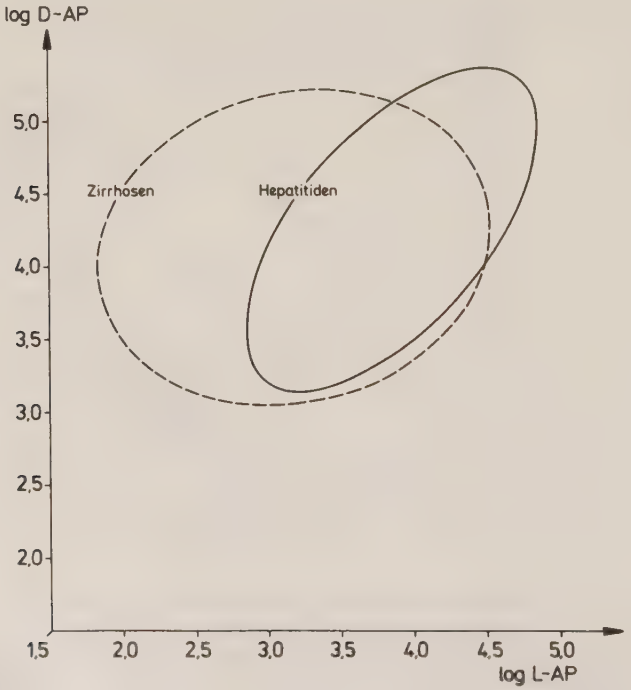

Abb.18

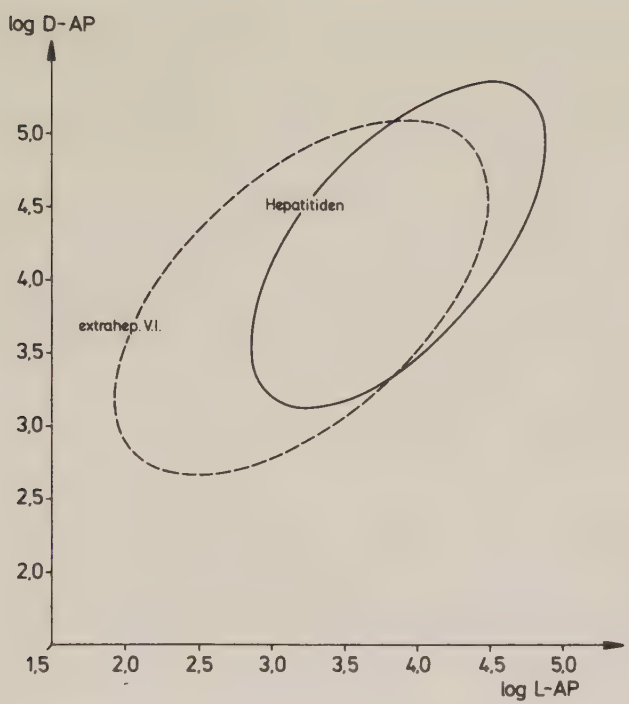

Abb.19

8. Verlaufsbeobachtungen bei Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus

Bei 4 Pat. mit Choledocholithiasis (2 Pat. mit vollständigem, 1 Pat. mit partiellem Choledochusverschluß, 1 Pat. mit weitgehend erhaltener Durchgängigkeit der Gallenwege) konnten die L-AP-Aktivitäten im Stuhl in 18 Einzelbestimmungen präoperativ und nach Beseitigung des Abflußhindernisses postoperativ gemessen werden (Abb.2o, Tab.III). Das arithmetische Mittel der L-AP-Aktivitäten dieser 4 Pat. stieg von präoperativ 2217,5 auf postoperativ 22o84,7 mU/g Stuhl, also um das ca. zehnfache an. Alle 4 Pat. zeigten postoperativ einen guten Abfluß der Galle in den Darm, nachweisbar an der Wiederbraunfärbung des Stuhls sowie der Normalisierung der pathologischen Bilirubinwerte im Serum.

Bei 2 Pat. (S.,S. und S.,H.) wurde präoperativ eine endoskopische retrograde Cholangiopankreaticographie durchgeführt, wobei bei einem Pat. (S.,H.) die L-AP-Aktivität im Stuhl vor

und nach dieser Untersuchung bestimmt werden konnte. Unmittelbar vor der ERCP wurde eine L-AP-Aktivität von 2493 mU/g Stuhl, unmittelbar danach eine L-AP-Aktivität von 29447 mU/g Stuhl und einen Tag später eine L-AP-Aktivität von 5453 mU/g Stuhl gemessen. Dies weist darauf hin, daß es während der ERCP kurzfristig durch Anheben des Gellensteins zu einem Abfluß gestauter Galle gekommen ist, der sich exakt in den L-AP-Aktivitäten im Stuhl widerspiegelt. Parallel zu diesen Veränderungen fiel der Bilirubinwert im Serum von 16,4 mg% auf 1o,o mg% ab, während die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum mit 53 U/l nach gegenüber 54 U/l vor der Untersuchung keine Veränderung aufwies.

Die Berechnung des D-AP/L-AP-Quotienten im Stuhl zeigt einen der L-AP-Aktivitätsbestimmung entsprechenden Verlauf: bei allen 4 Pat. fällt der Quotient postoperativ erwartungsgemäß ab. Der Vergleich der prä- und postoperativ gemessenen D-AP-Aktivitäten im Stuhl erklärt den insgesamt weniger deutlichen Verlauf der Quotientenkurven: das arithmetische Mittel der D-AP-Aktivität im Stuhl aller 4 Pat. mit Choledocholithiasis liegt präoperativ bei 2824o,1 mU/g, postoperativ bei

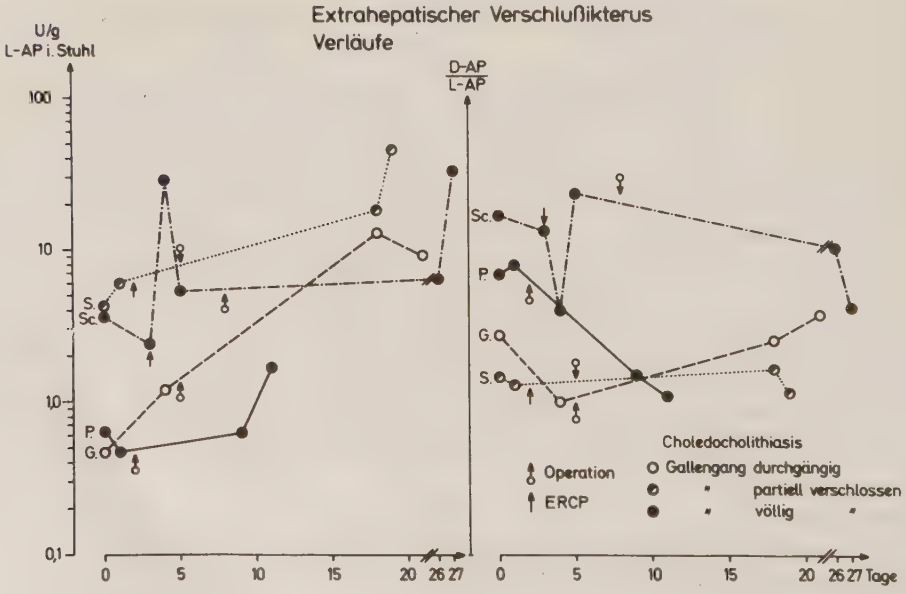

Abb.2o

45397,9 mU/g, was einem Aktivitätsanstieg um 6o,8% entspricht (Tab.IV). Dieser Aktivitätsanstieg, der deutlich geringer ist als die postoperative L-AP-Aktivitätszunahme, dürfte Folge der andersartigen postoperativen Ernährung und somit auch der veränderten Stuhlmenge und Stuhlkonsistenz sein.

22 Bestimmungen bei 4 weiteren Pat. mit malignem extrahepatischem Verschlußikterus (2 Pat. mit vollständigem und 2 Pat. mit partiellem Verschluß der extrahepatischen Gallenwege) zeigten ebenfalls eine postoperative L-AP-Aktivitätszunahme im Stuhl (Abb.21, Tab.III). Präoperativ betrug das arithmetische Mittel der L-AP-Aktivitäten im Stuhl 2492,5 mU/g, postoperativ 6115,o mU/g, was ungefähr einem Anstieg um den Faktor 2,5 entspricht. Bei 3 dieser Pat. wurde präoperativ eine ERCP

Pat.	Diagnose	präoperativ				nach ERCP	postoperativ			
		Bilirubin (mg%)	Gesamt-AP im Serum* (mU/ml)	SGOT ($\frac{mU}{ml}$)	L-AP im Stuhl (mU/g)	L-AP im Stuhl (mU/g)	Bilirubin (mg%)	Gesamt-AP im Serum** (mU/ml)	SGOT ($\frac{mU}{ml}$)	L-AP im Stuhl (mU/g)
S.,H.	Choledocholithiasis	16,4	54	35	3583,5	29446,8	2,3	321	21	33o3o,2
S.,S.	Choledocholithiasis	12,9	16o	54	42o6,7	-	1,o	565	9	4456o,8
P.,B.	Choledocholithiasis	1o,1	117	33	623,2	-	9,6	44o	23	1713,8
G.,H.	Choledocholithiasis	-	-	-	47o,4	-	12,4	285	64	9o4o,5
E.,E.	Gallengangs-Ca	11,9	127	53	7o11,o	-	-	-	-	2228o,o
V.,W.	Pankreas-Ca	12,2	14o	21	779,o	2337,1	18,8	294	25	3271,9
K.,P.	Pankreaskopf-Ca	17,8	145	16	155,8	311,6	23,1	3oo	15	2648,6
S.,A.	Pankreaskopf-Ca	5,5	175	22	467,4	-	-	-	-	5297,3
Z.,K.	Choledocholithiasis	9,3	5o	92	2648,6	-	8,6	253	29	5o55,7
K.,M.	Gallengangs-Ca	11,6	155	19	9815,6	-	-	-	-	8257,9
A.,P.	Gallengangs-Ca bei Choledocholithiasis	4,2	1485	112	4oo6,1	-	3,6	84	23	14333,9
W.,S.	Pankreaskopf-Ca	11,6	261	44	1o9o,6	6543,7	5,8	1464	6o	3427,6

*Standardmethode **optimierte Methode

Tab.III

Pat.	Diagnose	D-AP-Aktivität im Stuhl (mU/g)						Anstieg in %
		präoperative Bestimmungen			postoperative Bestimmungen			
		n	$\bar{x}$	$\bar{\bar{x}}$	n	$\bar{x}$	$\bar{\bar{x}}$	
S.,H.	Choledocholithiasis	4	88651,4	2824o,1	2	1o54oo,2	45397,9	6o,8
S.,S.	Choledocholithiasis	2	1371o,2		2	4o43o,7		
P.,B.	Choledocholithiasis	2	3975,o		2	14o22,2		
G.,H.	Choledocholithiasis	2	6625,1		2	21735,1		
E.,E.	Gallengangs-Ca	2	2oo95,o	7971,2	2	44o87,6	24148,5	2o2,9
V.,W.	Pankreas-Ca	4	2339,8		2	249o,2		
K.,P.	Pankreaskopf-Ca	4	2335,1		3	566o,3		
S.,A.	Pankreaskopf-Ca	3	7115,5		2	44355,o		
Z.,K.	Choledocholithiasis	2	4939o,2	3o518,o	4	16893o,1	77372,2	153,5
K.,M.	Gallengangs-Ca	1	28511,5		2	19553,o		
A.,P.	Gallengangs-Ca bei Choledocholithiasis	2	4o198,1		3	117265,3		
W.,S.	Pankreaskopf-Ca	2	3971,7		1	3739,2		

Tab.IV

durchgeführt, infolge derer es im Gegensatz zu den Pat. mit Choledocholithiasis nur zu einem geringen Anstieg der L-AP-Aktivität im Stuhl kam, wohl bedingt durch die geringere Beeinflußbarkeit des Abflußhindernisses durch die Manipulation bei der ERCP.
Der D-AP/L-AP-Quotient fiel auch bei dieser Patientengruppe postoperativ erwartungsgemäß ab trotz Ansteigen des arithmetischen Mittels der D-AP-Aktivität im Stuhl um 2o2,9% von präoperativ 7971,2 mU/g auf postoperativ 24148,5 mU/g (Tab.IV).

17 Bestimmungen wurden bei 4 weiteren Pat. durchgeführt, deren extrahepatischer Verschlußikterus im Verlauf Besonderheiten aufwies (Abb.22, Tab.III u. IV). Bei einer Pat. (Z.,K.) bestand eine Cholezystocholedocholithiasis mit partiellem Verschluß des Gallengangs sowie eine durch Stauperforation spontan entstandene Cholezysto-Colonfistel. Diese Fistel mag die relativ hohen L-AP-Aktivitäten im Stuhl präoperativ erklären. Im postoperativen Verlauf kam es zunächst zu einem geringen Abfall des Bilirubin im Serum von 9,3 auf 8,7 mg%, später zu einer Persistenz des Ikterus und im weiteren Verlauf zu einem erneuten Anstieg der Bilirubinwerte. Dies erklärt den völlig

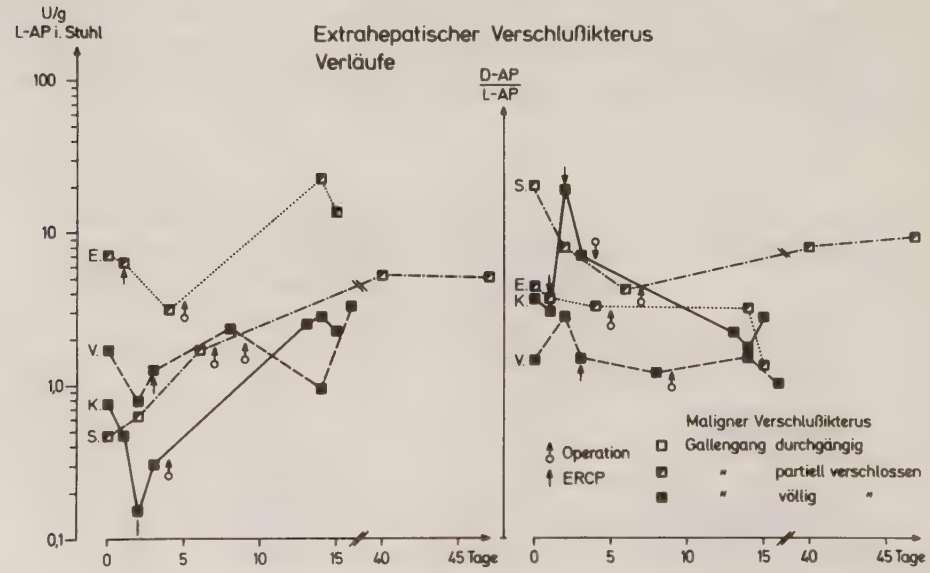

Abb.21

atypischen Verlauf der L-AP-Aktivitäten im Stuhl mit einem Abfall bis auf nicht mehr meßbare Werte. Bei einer zweiten Pat. (K.,M.) mit partiellem Verschluß der extrahepatischen Gallenwege durch ein den Choledochus infiltrierendes Gallenblasenkarzinom wurde eine Hepatico-Jejunostomie mit Roux'scher Anastomose angelegt. Die Progredienz des Gallenblasenkarzinoms führte zu einer Insuffizienz der Anastomose mit erneut unzureichendem Abfluß der Galle in den Darm. Dies erklärt die unveränderten L-AP-Aktivitäten im Stuhl. Eine weitere Pat. (A., P.) zeigte die Kombination einer Cholezystocholedocholithiasis und eines Adenokarzinoms des Choledochus sowie einer beginnenden sekundär biliären Leberzirrhose bei Zustand nach einer HB_s-Antigen-pos. Hepatitis, deren Höhepunkt anamnestisch und biochemisch 4 Monate vor Auftreten des extrahepatischen Verschlußikterus anzunehmen war. Die Operation (Cholezystektomie und Choledocho-Jejunostomie mit Braunscher Anastomose) war suffizient, jedoch kam es infolge der Begleiterkrankungen nur zu einem sehr langsamen Rückgang des Ikterus mit entsprechend lamgsamer Zunahme der L-AP-Aktivitäten im Stuhl. Bei einem anderen Pat. (W.,S.) war eine Choledochoduodenostomie als Palliativoperation wegen eines den Ductus Choledochus völlig verschließenden Pankreaskopfkarzinoms angelegt worden. Trotz Abfall des Bilirubins im Serum stieg die L-AP-Aktivität im

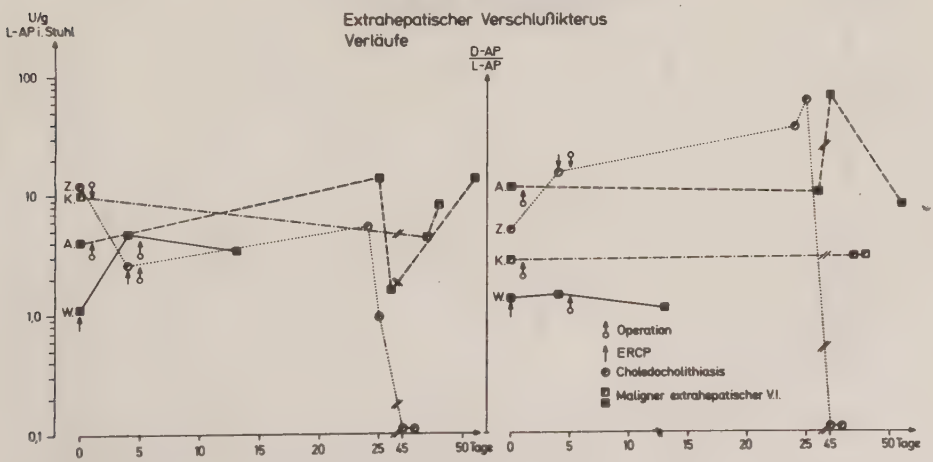

Abb.22

Stuhl postoperativ nicht an. Eine weitere Verlaufskontrolle war bei diesem Pat. nicht möglich, sodaß dieser Befund ungeklärt bleibt.
Im Gegensatz zu den anderen Gruppen zeigten diese 4 Pat. postoperativ insgesamt keinen Anstieg der L-AP-Aktivität im Stuhl. Das arithmetische Mittel der L-AP-Aktivitäten im Stuhl betrug 6465 mU/g vor und 6232 mU/g nach Operation. Dementsprechend zeigten auch die D-AP/L-AP-Quotienten postoperativ keinen deutlichen Abfall, obwohl das arithmetische Mittel der D-AP-Aktivitäten im Stuhl um 153,5% von 3o518,o mU/g auf 77372,2 mU/g anstieg.

9. Verhältnis von L-AP-Aktivität im Stuhl zur Gesamt-Bilirubin-Konzentration im Serum

9.1. Pat. mit intrahepatischer Cholestase

Bei 44 Bestimmungen von 36 Pat. mit intrahepatischer Cholestase wurde die L-AP-Aktivität im Stuhl mit dem Gesamtbilirubinspiegel im Serum verglichen (Abb.23). Ein Zusammenhang ist zwischen diesen beiden Parametern nicht erkennbar. Auch bei Aufschlüsselung des Gesamtkollektivs in Pat. mit Leberzirrhose

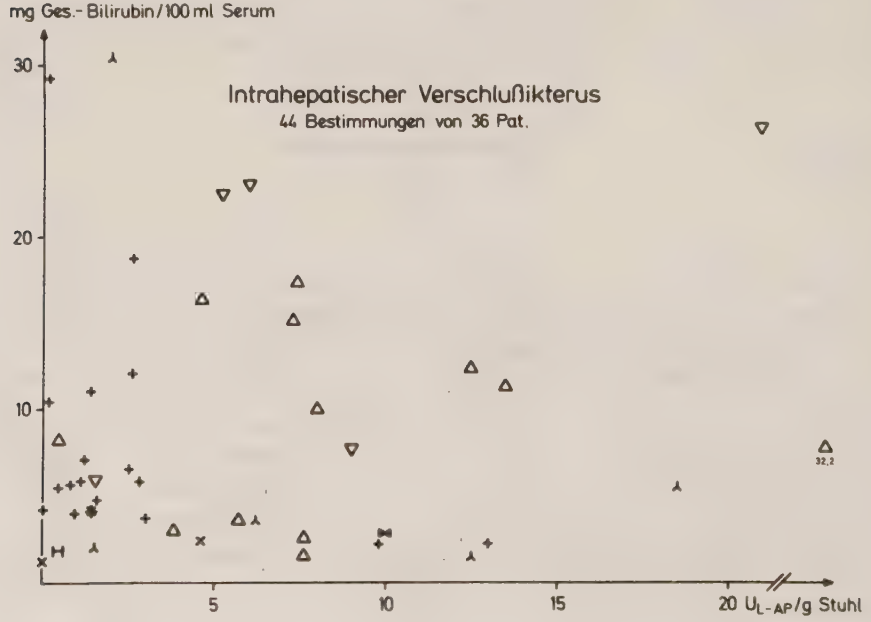

Abb.23

und entzündlichen Lebererkrankungen ergibt der Vergleich dieser Parameter gegenüber der alleinigen L-AP-Aktivitätsbestimmung im Stuhl keine weiteren diagnostischen Aufschlüsse.

9.2. Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus

Die Gesamtbilirubinkonzentration im Serum bei 31 Bestimmungen von 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus liegt im gleichen Bereich wie die Bilirubinwerte von Pat. mit intrahepatischer Cholestase (Abb.24). Erwartungsgemäß hat die Genese des Verschlusses keinen Einfluß auf die Höhe des Bilirubinspiegels im Serum, wohl aber auf das Ausmaß des Verschusses. Die Differentialdiagnose zwischen intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom durch Beurteilung der L-AP-Aktivitäten im Stuhl kann also durch die Zuhilfenahme des Bilirubinspiegels im Serum nicht verbessert werden.

1o. Verhältnis von L-AP-Aktivität im Stuhl zur Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum

1o.1. Pat. mit intrahepatischer Cholestase

Die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum

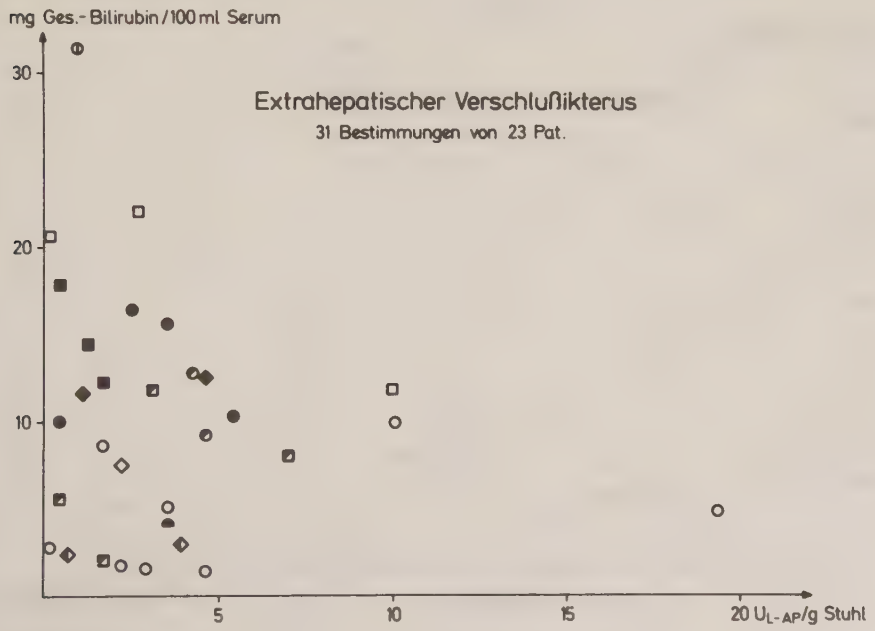

Abb.24

stieg bei 36 Pat. mit intrahepatischer Cholestase bis auf 25o mU/ml (Standardmethode) an (Abb.25), wobei keine wesentlichen Aktivitätsunterschiede zwischen den Patientengruppen mit intrahepatischer Cholestase bei akuter Hepatitis, Alkoholhepatitis, Leberzirrhose und Leberentzündung aus anderer Ursache erkennbar sind. Der Quotient aus Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum und L-AP-Aktivität im Stuhl liegt mit Ausnahme von 7 Pat., die eine L-AP-Aktivität von unter 1 U/g Stuhl aufwiesen, bei allen Pat. mit intrahepatischem Verschlußsyndrom unter 5o (Abb.26). Bei 16 von 19 Pat., nämlich 1o von 13 mit akuter Hepatitis, 3 von 13 mit Leberzirrhose und 3 von 5 mit Alkoholhepatitis, deren L-AP-Aktivität im Stuhl unter 3 U/g lag, ist der Quotient aus Ges.-AP im Serum/L-AP im Stuhl geringer als 1o. Dies entspricht einem Anteil von 44,4% am Gesamtkollektiv der Pat. mit intrahepatischer Cholestase bzw. einem Anteil von 56,5% bei Ausschluß aller Pat. mit Leberzirrhose. Im einzelnen zeigen gegenüber 76,9% der Pat. mit akuter Hepatitis und 6o% der Pat. mit Alkoholhepatitis nur 23,1% der Pat. mit Leberzirrhose einen Quotienten unter 1o.

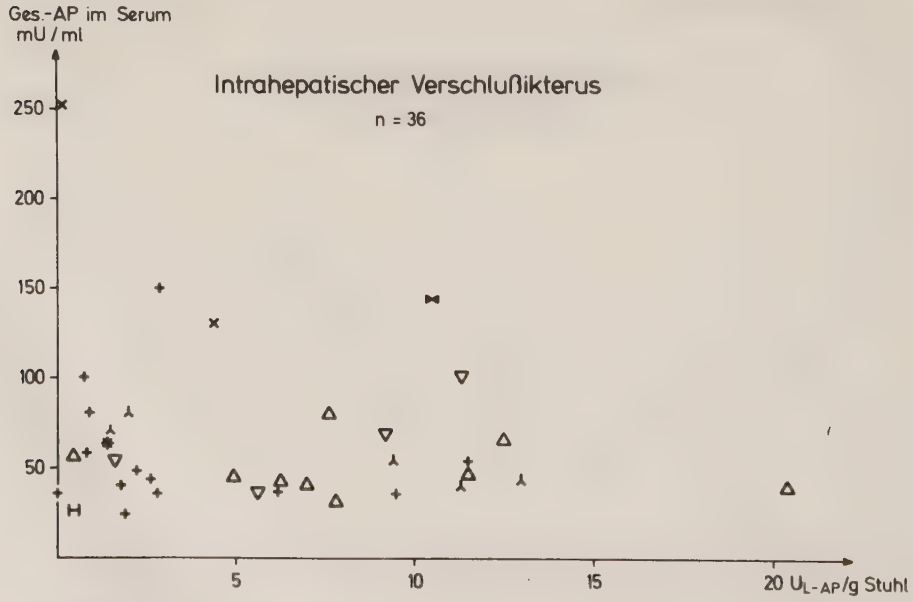

Abb.25

1o.2. Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus

Die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum lag bei 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus zwischen 25 und 1485 mU/ml (Abb.27); mit Ausnahme eines Pat. lag sie stets im pathologischen Bereich (über 4o mU/ml). Ebenso wie beim intrahepatischen Verschlußsyndrom besteht bei diesem Kollektiv keine eindeutige Korrelation zwischen Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum und L-AP-Aktivität im Stuhl. Auffällig ist die im Vergleich zu Pat. mit intrahepatischer Cholestase deutlich erhöhte Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum. Keiner der 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus zeigt einen Aktivitätsquotienten unter 1o (Abb.26). Ausschließlich 3 Pat., bei denen wegen einer L-AP-Aktivität unter 1 U/g Stuhl die Verwertung des Aktivitätsquotienten nicht sinnvoll erscheint, liegt bei 8 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus der Quotient über 5o. Ausweislich der ERCP sind dieses 3 Pat. mit vollständigem und 2 Pat. mit partiellem Verschluß sowie 3 Pat. mit weitgehend erhaltener Durchgängigkeit der Gallenwege. Dies entspricht

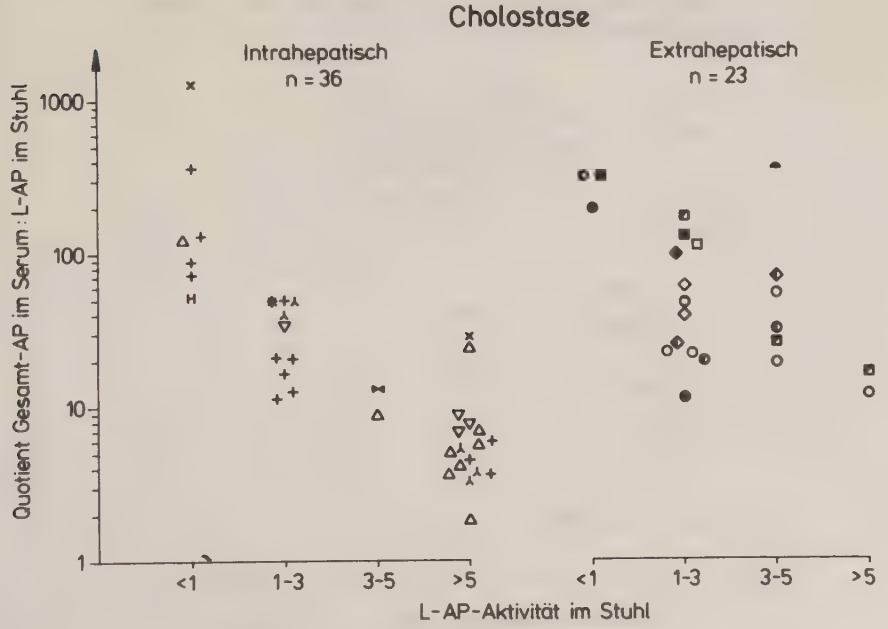

Abb.26

der Beobachtung, daß keine Beziehung zwischen der Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum und der Durchgängigkeit der Gallenwege bei der ERCP besteht.

Die Gegenüberstellung der absoluten Aktivitäten der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl bei Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom (Abb.1o u. 11) zeigte eine L-AP-Aktivität über 3 U/g Stuhl bei 52,8% der Pat. mit intrahepatischer Cholestase und eine L-AP-Aktivität unter 3 U/g Stuhl bei 65,2% der Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus. Aufgrund der breiten Streuung der Gesamtkollektive ist somit eine L-AP-Aktivität über 3 U/g Stuhl ebenso wenig für einen intrahepatischen wie eine L-AP-Aktivität unter 3 U/g Stuhl für einen extrahepatischen Verschlußikterus beweisend. Dagegen erlaubt die Berechnung des Quotienten aus Gesamtaktivität der

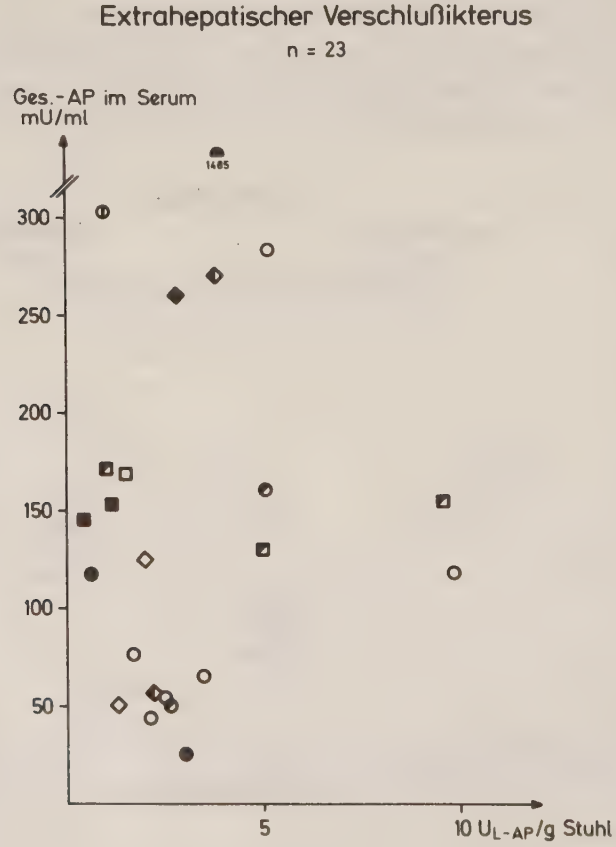

Abb.27

alkalischen Phosphatasen im Serum und L-AP-Aktivität im Stuhl bei 16 dieser 19 Pat. mit intrahepatischer Cholestase und L-AP-Aktivitäten über 3 U/g Stuhl eine eindeutige Abgrenzung gegenüber den Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus: sie zeigen im Gegensatz zu allen Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus einen Quotienten unter 1o. Bezogen auf das Gesamtkollektiv ist diese eindeutige Differenzierung in 44,4%, ohne Berücksichtigung der Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei Leberzirrhose in 56,5% aller Fälle möglich.

11. Korrelation zwischen L-AP-Aktivität im Stuhl und sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret

Bei 16 Pat. konnten die L-AP-Aktivität im Stuhl und im sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret untersucht werden (je 5 Pat. mit malignem extrahepatischem Verschlußikterus und extrahepatischem Verschluß durch Gallengangskonkremente, je 2 Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei Virushepatitis und Alkoholhepatitis sowie 2 Pat. mit Oberbauchbeschwerden ohne klinisch-chemisch und/oder endoskopisch faßbaren pathologi-

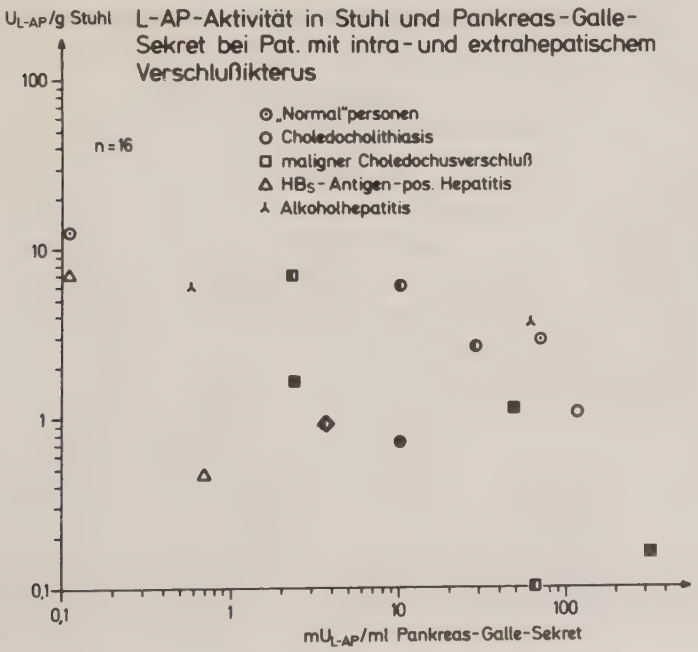

Abb.28

Pat.	Diagnose	Gallen-gang	Pankreas-gang	L-AP-Aktivität		Bilirubin im Serum (mg%)	Gesamt-AP im Serum (mU/ml)
				im Stuhl (mU/g)	im Galle-Pankreas-Sekret (mU/ml)		
V.,W.	Pankreas-Ca	■	◩	1246,4	2,3	14,4	155
W.,S.	Pankreaskopf-Ca	■	□	1o9o,6	46,8	11,6	261
K.,P.	Pankreaskopf-Ca	■	■	155,8	397,o	17,8	145
P.,B.	Choledocholithiasis	●	0	623,2	1o,2	1o,1	117
G.,L.	Gallengangs-Ca	◩	□	7o11,1	2,3	1,5	253
E.,E.	Gallengangs-Ca	◩	□	c	€3,5	7,9	127
S.,S.	Chcledocholithiasis	●	0	6o76,3	1o,2	12,9	16o
Z.,K.	Choledocholithiasis	●	0	2o48,6	27,7	9,3	5o
M.,E.	Gallengangsstriktur	◆	◇	934,8	3,7	-	-

Tab.V

schen Befund (Normalpersonen)). Eine Korrelation konnte nicht gesichert werden (Abb.28). 4 Pat. mit vollständigem und 5 Pat. mit partiellem Choledochusverschluß zeigen zwar niedrige L-AP-Aktivitäten im Stuhl, jedoch zum Teil relativ hohe L-AP-Aktivitäten im Galle-Pankreas-Sekret (Tab.V). Insbesondere fällt auf, daß die höchste L-AP-Aktivität im Galle-Pankreas-Sekret bei einem Pat. mit komplettem Pankreasgangverschluß durch ein Pankreaskopfkarzinom gemessen wurde. 4 Pat. mit intrahepatischer Cholestase zeigen ebenso wie 2 Normalpersonen im Galle-Pankreas-Sekret L-AP-Aktivitäten in dem Bereich, der auch bei Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus beobachtet wird.

E. Diskussion

Die Differentialdiagnose zwischen intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom ist schwierig. Es gibt keinen klinisch-chemischen Parameter, der für eines der beiden Krankheitsbilder pathognomonisch ist. Bis zur Einführung moderner Cholangiographieverfahren (endoskopisch retrograde, perkutane transhepatische und transjuguläre Cholangiographie) und der Sonographie mit Geräten mit hohem Auflösungsvermögen war die Abgrenzung des intra- vom extrahepatischen Verschlußikterus eine der schwierigsten Differentialdiagnosen der inneren Medizin. Die unmittelbaren unterschiedlichen therapeutischen Konsequenzen (konservative Behandlung bei intrahepatischer

Cholestase bzw. chirurgischer Eingriff bei mechanischem extrahepatischem Verschlußikterus) zwangen häufig zu einer abschließenden Stellungnahme, ohne daß eine entscheidende Hilfe durch klinisch-chemische Daten vorlag.

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese geht davon aus, daß durch Induktion der alkalischen Leber- bzw. "Gallengangs"-Phosphatase bei intrahepatischer Cholestase nicht nur ein Anstieg der Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum erfolgt, sondern daß eher noch bei erhaltener Durchgängigkeit der Gallenwege mit einer Aktivitätszunahme der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl zu rechnen ist. Im Gegensatz dazu wäre bei Pat. mit einem extrahepatischen Verschlußikterus infolge mechanischer Obstruktion der Gallengänge eine verminderte Ausscheidung von alkalischer Leber- bzw. "Gallengangs"-Phosphatase in den Darm zu erwarten. Es wurde deshalb untersucht, ob bei Pat. mit intrahepatischer Cholestase die alkalische Leberphosphatase im Stuhl gegenüber Normalpersonen erhöht und bei Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus vermindert ist. Außerdem sollte geprüft werden, ob auf der Grundlage dieser Überlegungen die Differentialdiagnose zwischen intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom erleichtert werden kann.

Die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Stuhl setzt sich zusammen aus den Einzelaktivitäten der alkalischen Dünndarmphosphatase des Bürstensaums, der alkalischen Leberphosphatase und der alkalischen Phosphatase aus Bakterien. Da sich die klassischen, in der Einleitung beschriebenen Verfahren zur Trennung multipler molekularer Formen der alkalischen Phosphatase für die Routinebestimmung zur Differentialdiagnose zwischen intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom nicht eignen, wurde eine Immuntitrationsmethode zur Bestimmung der alkalischen Leber- und Dünndarmphosphatase im Stuhl entwickelt. Antikörper von Kaninchen gegen menschliche alkalische Leberphosphatase zeigen keine Kreuzreaktion mit alkalischer Dünndarmphosphatase (52,53) und alkalischer Phosphatase aus Bakterien. Die durch Antikörper vom Kaninchen gegen kristalline menschliche alkalische Leberphosphatase präzipitierbare Aktivität der gesamten alkalischen Phosphatase

im Stuhl entspricht somit der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl. Optimale Ergebnisse sind nur bei vollständiger Präzipitation des Enzyms durch seine Antikörper zu erreichen. Die Untersuchungen zur Methodik haben ergeben, daß die Präzipitation in Gegenwart von Polyäthylenglycol der Präzipitation mit Antikörpern in Puffer bzw. der Doppelantikörper-Methode über einen zweiten Präzipitationsschritt mit Anti-Kaninchen-γ-Globulin von der Ziege überlegen ist. Eine optimale Präzipitation ist außerdem nur mit Antikörpern gegen menschliche alkalische Leberphosphatase erreichbar (Präzipitation im homologen System). Die Immuntitration alkalischer Dünndarmphosphatase des Menschen, des Kalbes, der Ratte und alkalischer Phosphatase aus E. Coli hat ergeben, daß eine strenge Speziesabhängigkeit besteht; kristalline menschliche alkalische Dünndarmphosphatase wird durch Kreuzreaktion in geringem Umfang auch durch Anti-Kälberdünndarmphosphatase-Serum, jedoch nicht mehr durch Anti-Rattendünndarmphosphatase-Serum bzw. Anti-E.Coliphosphatase-Serum präzipitiert. Die Untersuchungen an alkalischer Kälber- und Rattendünndarmphosphatase verdeutlichen, daß in Abhängigkeit von der Phylogenese mit Kreuzreaktionen unterschiedlichen Ausmaßes gerechnet werden muß.

Die Aktivität der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl von Normalpersonen zeigt eine logarithmische Normalverteilung. Die bei Pat. mit intrahepatischer Cholestase gemessenen L-AP-Aktivitäten im Stuhl lagen im arithmetischen Mittel 2o% über, die bei Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus 35% unter dem arithmetischen Mittel der L-AP-Aktivitäten im Stuhl von Normalpersonen. Der Definition Verschlußsyndrom wurde eine Erhöhung des Gesamtbilirubins im Serum über 1,2 mg% durch Anstieg des direkten Bilirubins zugrunde gelegt. Unter Berücksichtigung der erheblichen Variabilität des Ausmaßes des Ikterus bei beiden untersuchten Kollektiven bestätigen diese Ergebnisse die eingangs aufgestellte Hypothese, daß bei intrahepatischem Verschlußsyndrom eher mit einer erhöhten, bei extrahepatischem Verschlußsyndrom eher mit einer erniedrigten L-AP-Aktivität im Stuhl gegenüber Normalpersonen zu rechnen ist. Bei Annahme eines (willkürlichen) Grenzwertes von 3 U/g Stuhl zeigten die meisten Pat. mit intrahepatischer Cholestase

Enzymaktivitäten über, die meisten Pat. mit extrahepatischem Verschlußsyndrom Enzymaktivitäten unter diesem Grenzwert. Die breite Überlappung der Aktivitätsbereiche beider Kollektive läßt jedoch aufgrund einer einmaligen Bestimmung der L-AP-Aktivität im Stuhl eine Differenzierung zwischen intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom nicht zu. Bei Berücksichtigung der Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum, die im wesentlichen durch eine Erhöhung der Aktivität der alkalischen Leberphosphatase bedingt ist, und Bildung eines Quotienten aus Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum und L-AP-Aktivität im Stuhl können allerdings 44,4% aller Pat. mit intrahepatischer Cholestase eindeutig von Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus abgegrenzt werden, da sie einen Quotienten unter 1o aufweisen, der von Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus stets überschritten wird. 34,8% aller Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus wiesen dabei einen Quotienten über 5o auf, der von Pat. mit intrahepatischer Cholestase nicht erreicht wird, wenn man Pat. mit einer L-AP-Aktivität unter 1 U/g Stuhl bei dieser Berechnung ausschließt.

Unter den Pat. mit intrahepatischem Verschlußsyndrom lassen sich deutlich 2 Kollektive voneinander trennen: während Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei akuter Virushepatitis, alkoholischer Fettleberhepatitis und Cholestase aus anderer Ursache deutlich erhöhte L-AP-Aktivitäten im Stuhl aufweisen, sind die Enzymaktivitäten bei Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei Leberzirrhose gegenüber Normalpersonen deutlich erniedrigt. Möglicherweise ist dieses auf eine verminderte Synthesekapazität der zirrhotischen Leber für alkalische Leberphosphatase zurückzuführen, möglicherweise auch auf eine gestörte Transport- und/oder Exkretionskapazität. Die diagnostische Sicherheit durch die Berechnung des Quotienten aus Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum und L-AP-Aktivität im Stuhl bei Pat. mit intrahepatischer Cholestase steigt von 44,4% im Gesamtkollektiv auf 56,5% im Kollektiv der Pat. ohne intrahepatische Cholestase bei Leberzirrhose (Quotient unter 1o).

Die L-AP-Aktivitäten im Stuhl und im sekretinstimulierten

Galle-Pankreas-Sekret zeigen keine Korrelation. Auffällig ist die hohe Aktivität der alkalischen Leberphosphatase im Galle-Pankreas-Sekret eines Pat. mit vollständigem Verschluß des Gallen- und Pankreasgangs durch ein Pankreaskopfkarzinom. Theoretisch dürfte bei diesem Pat. keine oder nur eine sehr geringe L-AP-Aktivität im Galle-Pankreas-Sekret nachweisbar sein. Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Befund ist die Synthese einer alkalischen Phosphatase im Tumorgewebe, die immunologisch mit alkalischer Leberphosphatase kreuzreagiert (36,37). Diese Annahme könnte auch die relativ hohe L-AP-Aktivität im Galle-Pankreas-Sekret bei einigen Pat. mit malignem Choledochusverschluß und partieller Durchgängigkeit des Gallengangs erklären. Die Beobachtung einer relativ hohen L-AP-Aktivität bei einer Pat. mit vollständigem Steinverschluß des Gallengangs bei erhaltener Durchgängigkeit des Pankreasgangs wird jedoch durch die Bildung einer kreuzreagierenden Tumorphosphatase-Variante nicht erklärt. Untersuchungen von F.-G. Lehmann (unpublizierte Ergebnisse) haben ergeben, daß aus normalem menschlichem Pankreasgewebe eine alkalische Phosphatase extrahiert werden kann, die immunologisch mit Antikörpern gegen kristalline menschliche alkalische Leberphosphatase kreuzreagiert. Diese Pankreasphosphatase könnte über den Pankreasgang selbst bei vollständigem Verschluß des Gallengangs in das Duodenum abgegeben werden. Der quantitative Anteil der alkalischen Pankreasphosphatase an der im Stuhl gemessenen alkalischen Leberphosphatase könnte nur durch parallele Aktivitätsmessungen in Darm, Pankreas- und Gallengang ermittelt werden. Die technische Durchführung einer solchen Untersuchung beim Menschen dürfte aber so schwierig sein, daß weitere immunologische Untersuchungen mit der Fragestellung, ob durch Kreuzabsorption der Antiseren gegen kristalline menschliche alkalische Leber- und Pankreasphosphatase mit den heterologen Antigenen monospezifische Antiseren gegen beide Enzyme hergestellt werden können, wahrscheinlich erfolgreicher sind. Jedenfalls können eine mit menschlicher alkalischer Leberphosphatase kreuzreagierende alkalische Pankreasphosphatase sowie eine hypothetische alkalische Tumorphosphatase-Variante die fehlende Korrelation der

Befunde im Stuhl und im sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret erklären.

Die präoperativen und postoperativen Verlaufskontrollen bei Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus zeigten, daß das Prinzip der Bestimmung alkalischer Leberphosphatase im Stuhl geeignet ist, eine Aussage über die mechanische Durchgängigkeit der Gallenwege zu machen. Die breite Überlappung der Aktivitäten der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl von Normalpersonen und Patienten mit intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom überrascht nicht, wenn man berücksichtigt, daß selbst eine Vielzahl von Faktoren, die unter Normalbedingungen die Enzymaktivität im Stuhl beeinflussen können, noch unbekannt sind und daher bei der Durchführung dieser Studie nicht berücksichtigt werden konnten. Es wurde versucht, den Einfluß eines variablen Verdünnungsfaktors infolge unterschiedlicher Stuhlmenge und/oder -konsistenz durch Bestimmung eines Quotienten aus alkalischer Dünndarm- und Leberphosphatase-Aktivität auszuschließen. Die Bildung dieses Quotienten geht von der Vorstellung aus, daß der Verdünnungsfaktor beide Enzyme in gleicher Weise betrifft und die Ausscheidung der alkalischen Dünndarmphosphatase in den Stuhl annähernd konstant ist. Die Aussagekraft dieses Quotienten wird folglich vermindert durch Untersuchungen, wonach die Aktivität der alkalischen Dünndarmphosphatase des Bürstensaumes in Abhängigkeit von der Nahrungsmenge und -zusammensetzung schwankt. Außerdem ist bekannt, daß die Exkretion der alkalischen Phosphatase des Bürstensaums in den Darm mit dem Anteil der im Lumen vorhandenen Gallensäuren korreliert (57), ein Befund, mit dem die in dieser Arbeit beobachtete postoperative Zunahme der D-AP-Aktivität im Stuhl bei Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus zu vereinbaren ist.

In Anbetracht der Vielzahl noch unbekannter Faktoren, die die Aktivität der alkalischen Leber- und Dünndarmphosphatase im Stuhl beeinflussen können, ist es bemerkenswert, in welch hohem Prozentsatz es durch die in dieser Arbeit angewendete Methode gelungen ist, Pat. mit intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom zu unterscheiden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß durch Standardisierung der Untersuchungstech-

nik und methodische Verbesserungen eine deutliche Erhöhung der differentialdiagnostischen Aussage zu erwarten ist. Die in dieser Arbeit erstmals durchgeführte isolierte Bestimmung der Aktivität der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl stellt als eine einfache, in jedem Routinelaboratorium durchführbare billige Methode eine sinnvolle Ergänzung des diagnostischen Arsenals bei der Differentialdiagnose zwischen intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom dar. Über die klinisch-differentialdiagnostischen Anwendungsmöglichkeiten hinaus weisen diese Untersuchungsergebnisse die Immuntitration als ein zur Differenzierung von Isoenzymen gut geeignetes Verfahren aus.

F. Zusammenfassung

Es wurden in dieser Arbeit methodische Untersuchungen zur immunologischen Bestimmung der Aktivität der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl durchgeführt. Die PEG-Präzipitation erwies sich der Doppelantikörpermethode sowie der Messung der Immunpräzipitation ohne Zusatz deutlich überlegen. Untersuchungen zur immunologischen Verwandschaft der alkalischen Dünndarmphosphatase des Menschen, des Rindes, der Ratte sowie alkalischer Phosphatase aus E. Coli zeigten, daß in Abhängigkeit von der Phylogenese mit Kreuzreaktionen unterschiedlichen Ausmaßes gerechnet werden muß. Eine Kreuzreaktion zwischen alkalischer Phosphatase aus E. Coli und menschlicher alkalischer Dünndarmphosphatase wurde ausgeschlossen.

Die differentialdiagnostische Bedeutung der Bestimmung der Aktivität der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl wurde an 36 Pat. mit intra- und 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus überprüft. Insgesamt wurden 59 Aktivitätsbestimmungen der alkalischen Leber- und Dünndarmphosphatase bei 36 Pat. mit intra- und 46 Aktivitätsbestimmungen bei 23 Pat. mit extrahepatischem Verschlußsyndrom mit 42 Aktivitätsbestimmungen von 42 Normalpersonen verglichen. Die Aktivität der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl war bei Pat. mit intrahepatischer Cholestase gegenüber Normalpersonen deutlich erhöht, bei Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus deutlich

erniedrigt. Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei entzündlichen Lebererkrankungen zeigten deutlich höhere L-AP-Aktivitäten im Stuhl als Pat. mit intrahepatischer Cholestase bei Leberzirrhose. Bei Berücksichtigung der Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatasen im Serum kann die Differenzierung zwischen intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom verbessert werden. Bei 12 Pat. mit extrahepatischem Verschlußikterus konnte die Aktivität der alkalischen Leber- und Dünndarmphosphatase im Stuhl in 57 Bestimmungen prä- und postoperativ beobachtet werden. Die L-AP-Aktivität stieg nach operativer Beseitigung des Abflußhindernisses im Stuhl deutlich an. Bei 16 Pat. wurde die Aktivität der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl und im endoskopisch gewonnenen sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret verglichen. Eine Korrelation konnte nicht gesichert werden.

Die in dieser Arbeit erstmals durchgeführte isolierte Bestimmung der Aktivität der alkalischen Leberphosphatase im Stuhl stellt als eine einfache, in jedem Routinelaboratorium durchführbare Methode eine sinnvolle Ergänzung des diagnostischen Arsenals bei der Differenzierung zwischen intra- und extrahepatischem Verschlußsyndrom dar.

G. Literaturverzeichnis

1. Bahr,M., Wilkinson,J.H.: Urea as a selective inhibitor of human tissue alkaline phosphatases. Clin.Chim.Acta 17: 367 (1967)
2. Beckman,L., Beckman,G.: A genetic variant of placental alkaline phosphatase with unusual electrophoretic properties. Acta Genet.(Basel) 18: 543 (1968)
3. van Belle,H.: Kinetics and inhibition of alkaline phosphatase from canine tissues. Biochim.Biophys.Acta 289: 158 (1972)
4. Beratis,N.G., Hirschhorn,K.: Properties of placental alkaline phosphatase. III. Thermostability and urea inhibition of isolated components of the three phenotypes. Biochem.Genet.6: 1 (1972)
5. Bessey,O.A., Lowry,O.H., Brock,M.J.: Methods for rapid determination of alkaline phosphatase with 5 cubic millimeter serum. J.Biol.Chem.164: 321 (1946)
6. Birkett,D.J., Conyers,R.A.J., Neale,F.C., Posen,S., Brudenell-Woods,J.: Action of urea on human alkaline phosphatases: with a description of some automated techniques for the study of enzyme kinetics. Arch.Biochem.Biophys. 121: 47o (1967)
7. Brunel,C., Cathala,G.: Imidazole: an inhibitor of L-phenylalanine-insensitive alkaline phosphatases of tissues other than intestine and placenta. Biochim.Biophys.Acta 268: 415 (1972)
8. Butterworth,P.J., Moss,D.W.: The effect of urea on human kidney alkaline phosphatase. Biochem.J.99: 93 (1966)
9. Butterworth,P.J., Moss,D.W.: The effect of urea on human alkaline phosphatase preparations. Enzymologia 32: 269 (1967)
1o. Byers,D.A., Fernley,H.N., Walker,P.G.: Studies on alkaline phosphatase. Inhibition of human placental phosphoryl phosphatase by L-phenylalanine. Eur.J.Biochem.29: 197 (1972)
11. Chiandussi,L., Greene,S.F., Sherlock,S.: Serum alkaline phosphatase fractions in hepatobiliary and bone disease. Clin.Sci.22: 425 (1962)

12. Dingjan,P.G., Postma,T., Stroes,J.A.P.: Quantitative differentiation of human serum alkaline phosphatase isoenzymes with polyacrylamide disc gel electrophoresis. Z. Klin.Chem.Klin.Biochem.11: 167 (1973)
13. Engstrom,L.: Studies on calf-intestinal alkaline phosphatase. II. Incorporation of inorganic phosphatase into a highly purified enzyme preparation. Biochim.Biophys.Acta 52: 49 (1961)
14. Fernley,H.N.: Mammalian alkaline phosphatases, chap 18, The Enzymes, vol 4, New York, Academic Press, Inc., p.417 (1971)
15. Fernley,H.N., Walker,P.G.: Studies on alkaline phosphatase. Transient-state and steady-state kinetics of Escherichia coli alkaline phosphatase. Biochem.J.111: 187 (1969)
16. Fernley,H.N., Bisaz,S.: Studies on alkaline phosphatase phosphorylation of calf-intestinal alkaline phosphatase by ^{32}P-labelled pyrophosphate. Biochem.J.1o7: 279 (1968)
17. Fernley,H.N., Walker,P.G.: Studies on alkaline phosphatase inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity. Biochem.J.1o4: 1o11 (1967)
18. Fishman,L., Inglis,N.R., Fishman,W.H.: Preparation of two antigens of human liver isoenzymes of alkaline phosphatase. Clin.Chim.Acta 34: 393 (1971)
19. Fishman,L., Inglis,N.R., Fishman,W.H.: Preparation and characterization of human intestinal alkaline phosphatase antigens. Clin.Chim.Acta 38: 75 (1972)
2o. Fishman,W.H.: Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. Am.J.Med.56: 617 (1974)
21. Fishman,W.H., Inglis,N.R., Krant,M.J.: Serum alkaline phosphatase of intestinal origin in patients with cancer and with cirrhosis of the liver. Clin.Chim.Acta 12: 298 (1965)
22. Fishman,W.H., Ghosh,N.K.: Isoenzymes of human alkaline phosphatase. Adv.Clin.Chem.1o: 115 (1967)
23. Fishman,W.H., Inglis,N.R., Green,S., Anstiss,C.L., Ghosh, N.K., Reif,H.E., Rustigan,R., Krant,M.J., Stolbach,L.L.: Immunology and biochemistry of Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in human cancer. Nature (Lond) 219: 697 (1968)

24. Fishman,W.H., Sie,H.G.: L-homoarginine, an inhibitor of serum bone and liver alkaline phosphatase. Clin.Chim.Acta 29: 339 (197o)
25. Flock,E.V., Bollman,J.L.: Alkaline phosphatase in the intestinal lymph of the rat. J.Biol.Chem.175: 439 (1948)
26. Fritsche,H.A., Adam-Part,H.R.: Cellulose acetate electrophoresis of alkaline phosphatase isoenzymes in human serum and tissue. Clin.Chem.18: 417 (1972)
27. Glickman,R.M., Alpers,D.H., Drummey,G.D., Isselbacher, V.J.: Increased lymph alkaline phosphatase after fat feeding: effects of medium chain triglycerides and inhibition of proteinsynthesis. Biochim.Biophys.Acta 2o1: 226 (197o)
28. Ghosh,N.K., Fishman,W.H.: Purification and properties of molecular weight variants of human placental alkaline phosphatase. Biochem.J.1o8: 779 (1968)
29. Ghosh,N.K., Fishman,W.H.: L-phenylalanine inhibition of rat intestinal alkaline phosphatase: a homosteric phenomenin. Arch.Biochem.Biophys.126: 7oo (1968)
3o. Ghosh,N.K., Fishman,W.H.: On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine. J.Biol.Chem.241: 2516 (1966)
31. Gottlieb,A.J., Sussman,H.H.: Human placental alkaline phosphatase: molecular weight and subunit structure. Biochim.Biophys.Acta 16o: 167 (1968)
32. Green,S., Cantor,F., Inglis,N.R., Fishman,W.H.: Normal serum alkaline phosphatase isoenzymes examined by isoenzyme analysis using organ-specific inhibitors. Am.J.Clin. Pathol.57: 52 (1972)
33. Green,S., Anstiss,C.L., Fishman,W.H.: Automated differential isoenzyme analysis. II. The fractionation of serum alkaline phosphatases into "liver", "intestinal" and "other" components. Enzymologia 41: 9 (1971)
34. Gutman,A.B.: Serum alkaline phosphatase activity in diseases of the skeletal and hepatobiliary systems. Am.J.Med. 27: 875 (1959)
35. Harkness,D.R.: Studies on human placental alkaline phosphatase. I. Purification and crystallization. Arch.Biochim.Biophys.126: 5o3 (1968)

36. Higashino,K., Hashinotsume,M., Yamamura,Y.: Effect of neuraminic acid removal and the properties of a variant alkaline phosphatase in hepatoma. Clin.Chim.Acta 4o: 3o5 (1972)
37. Higashino,K., Hashinotsume,M., Kang,K.Y., Takahashi,Y., Yamamura,Y.: Studies on a variant alkaline phosphatase in sera of patients with hepatocellular carcinoma. Clin.Chim. Acta 4o: 67 (1972)
38. Inglis,N.I., Krant,M.J., Fishman,W.H.: Influence of a fat enriched meal on human serum (L-phenylalanine-sensitive) "intestinal" alkaline phosphatase. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 124: 699 (1967)
39. Inglis,N.R., Kirley,S., Stolbach,L.L., Fishman,W.H.: Phenotypes of the Regan isoenzyme and identity between the placental D-variant and the Nagao isoenzym. Cancer Res. 33: 1657 (1973)
4o. Jendrassik,L., Gróf,P.: Biochem.Z.297: 81 (1938)
41. Kaplan,M.M., Rodgers,L.: Separation of human serum alkaline phosphatase isoenzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. Lancet 2: 1o29 (1969)
42. Kaplan,M.M., Righetti,A.: Induction of rat liver alkaline phosphatase; the mechanism of the serum elevation in bile-duct obstruction. J.Clin.Invest.49: 5o8 (197o)
43. Kaplan,M.M.: Progress in hepatology: Alkaline phosphatase Gastroenterology 62: 452 (1972)
44. Keiding,N.R.: The alkaline phosphatase fractions of human lymph. Clin.Sci.26: 291 (1964)
45. Keiding,N.R.: Intestinal alkaline phosphatase in human lymph and serum. Scand.J.Clin.Lab.Invest.18: 134 (1966)
46. Kellen,J.A., Lustig,V.: Patterns of amino-acid inhibition of alkaline phosphatases as an aid in cancer diagnosis. Oncology 25: 239 (1971)
47. Lam,K.C., Mistilis,S.P.: Role of intestinal alkaline phosphatase in fat transport. AJEBAK 51: 411 (1973)
48. Lazdunski,M., Petitclerc,C., Chappelet,D., Lazdunski,C.: Flipflop mechanism in enzymology. A model: the alkaline phosphatase of Escherichia coli. Eur.J.Biochem.2o: 124 (1971)

49. Lehmann,F.-G.: Regan-Isoenzym der alkalischen Phosphatase im Serum bei malignen Tumoren. Klin.Wschr.53: 585 (1975)
5o. Lehmann,F.-G.: Immunological relationship between placental and other human alkaline phosphatases. Prot.Biol. Fluids 24: (1976)
51. Lehmann,F.-G.: Glutamate dehydrogenase from human liver. III. Antibody-binding sites and properties of the antigen-antibody complex. Biochim.Biophys.Acta 235: 259 (1971)
52. Lehmann,F.-G.: New method for the isolation and crystallization of human liver alkaline phosphatase. Digestion 12: 123 (1975)
53. Lehmann,F.-G.: Immunological relationship between human placental and intestinal alkaline phosphatase. Clin.Chim. Acta 65: 257 (1975)
54. Lin,C.W., Sie,H.G., Fishman,W.H.: L-tryptophan. A nonallosteric organ-specific incompetitive inhibitor of human placental alkaline phosphatase. Biochem.J.124: 5o9 (1971)
55. Lin,C.W., Fishman,W.H.: L-homoarginine: an organ-specific uncompetetive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphohydrolases. J.Biol.Chem.247: 3o82 (1972)
56. Linscheer,W.G., Malagelada,J.R., Fishman,W.H.: Deminished oleic acid absorption by L-phenylalanine inhibition of an intestinal phosphohydrolase. Nature New Biol.231: 116 (1971)
57. Linscheer,W.G., Malagelada,J.R., Stolbach,L.L., Fishman, W.H.: The effect of fatty acid perfusion on intestinal alkaline phosphatase. Am.J.Dig.Dis.77: 5o9 (1977)
58. Madsen,N.B., Tuba,J.: On the source of the alkaline phosphatase in rat serum. J.Biol.Chem.195: 741 (1952)
59. Madsen,N.B., Tuba,J.: The role of alkaline phosphatase in intestinal absorption. The kinetics of phosphatase action on various substrates. Can.J.Med.Sci.31: 1 (1953)
6o. Markert,C.L., Moller,F.: Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. Proc. Nat.Acad.Sci.45: 753 (1959)
61. Moog,F.: The control of enzyme activity in mammals in early development and in old age; Enzyme Synthesis and Degradation in Mammalian Systems. Basel, S.Karger, p.47 (1971)

62. Moog,F., Etzler,M.E., Grey,R.D.: The differentiation of alkaline phosphatase in the small intestine. Ann.NY Acad. Sci.166: 447 (1969)
63. Morton,R.K.: Separation and purification of isoenzymes associated with insoluble particles. Nature (Lond) 166: 1092 (1950)
64. Morton,R.K.: The purification of alkaline phosphatase of animal tissues. Biochem.J.57: 595 (1954)
65. Moss,D.W.: The heterogeneity of human alkaline phosphatase. Federation of European Biochemical Societies, Symposium 18: 277 (1970)
66. Moss,D.W., Walli,A.K.: Intermediates in the hydrolysis of ATP by human alkaline phosphatase. Biochim.Biophys.Acta 191: 476 (1969)
67. Moss,D.W., Shakespeare,M.J., Thomas,D.M.: Observations on the heat-stability of alkaline phosphatase isoenzymes in serum. Clin.Chim.Acta 40: 35 (1972)
68. Nakayama,T., Yoshida,M., Kitamura,M.: L-leucine sensitive, heat-stable alkaline phosphatase isoenzyme detected in a patient with pleuritis carcinomatosa. Clin.Chim.Acta 30: 546 (1970)
69. Nakayama,T., Yoshida,M., Kitamura,M., Saito,K.: Heat-stable alkaline phosphatase isoenzyme (Nagao isoenzyme) detected in adenocarcinoma of pancreas tail. Rynsho-Kagaku 11: 80 (1971)
70. Neumann,H.: Substrate selectivity in the action of alkaline and acid phosphatases. J.Biol.Chem.243: 4671 (1968)
71. Newton,M.A.: A distinctive fraction of alkaline phosphatase in health and disease. J.Clin.Pathol.19: 491 (1966)
72. Pankovitch,A.M., Sclamberg,E.L., Stevens,J.: Organ-specific and cross-reacting isoenzymes in human alkaline phosphatases. Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.43: 401 (1972)
73. Plocke,D.J., Levinthal,C., Vallee,B.L.: Alkaline phosphatase of Escherichia coli: a zinc metalloenzyme. Biochemistry 1: 373 (1962)
74. Polin,S.G., Spellberg,M.A., Teitelman,L., Okumura,M.: The origin of elevation of serum alkaline phosphatase in hepatic disease. An experimental study. Gastroenterology 42: 431 (1962)

75. Posen,S.: Alkaline phosphatase. Ann.Intern.Med.67: 183 (1967)
76. Posen,S., Neale,F.C., Birkett,D.J., Brudenell-Woods,I.: Intestinal alkaline phosphatase in human sera. Am.J.Clin. Pathol.48: 81 (1967)
77. Przelecka,A.E., Sarzala,M., Taracha,M.: Alkaline phosphatase activity and synthesis of intestinal phospholipids. J.Histochem.Cytochem.1o: 596 (1962)
78. Rhone,D.P., Mizuno,F.M., Gidaspow,H.: Profiles of serum isoenzymes of alkaline phosphatase in hepatobiliary disorders using cellulose acetate electrophoresis and organ-specific inhibitors. Ann.Clin.Lab.Sci.3: 353 (1973)
79. Rhone,D.P., Mizuno,F.M.: Profiles of alkaline phosphatase isoenzymes in serum using cellulose acetate electrophoresis and organ-specific inhibitors. Am.J.Clin.Pathol.59: 531 (1973)
8o. Romslo,I., Bjark,P., Solberg,C.O.: Ectopic alkaline phosphatase production in metastasizing ventricular carcinoma. Scand.J.Clin.Lab.Invest.28: 21 (1971)
81. Rothman,F., Byrne,R.: Fingerprint analysis of alkaline phosphatase of Escherichia coli K 12. J.Mol.Biol.6: 33o (1963)
82. Rufo,M.B.: The morphology of two isoenzymes of alkaline phosphatase in the intestine. Thesis. Ph.D. degree, Tufts University School of Medicine (1973)
83. Rufo,M.B., Malagelada,J., Linscheer,W.G., Fishman,W.H.: Metabolic variants of intestinal alkaline phosphatase in relation to fat absorption: in situ demonstration with the organ specific inhibitors L-phenylalanine and L-homoarginine. Histochemie 33: 313 (1973)
84. Rufo,M.B., Fishman,W.H.: L-homoarginine: a specific inhibitor of liver-type alkaline phosphatase, applied to the recognition of liver-type enzyme activity in rat intestine. J.Histochem.Cytochem.2o: 336 (1972)
85. Schlesinger,M.J., Barrett,K.: The reversible dissociation of the alkaline phosphatase of Escherichia coli. I. Formation and reactivation of subunits. J.Biol.Chem.24o: 4284 (1965)

86. Schlesinger,M.J.: Activiation on a mutationally altered form of the Escherichia coli alkaline phosphatase by zinc. J.Biol.Chem.241: 3181 (1968)
87. Schmidt,V., Dubach,V.C.: Alkaline phosphatase: a marker enzyme for brush border membrane? Experientia 28: 385 (1972)
88. Sebesta,D.G., Bradshaw,F.J., Prockop,D.J.: Source of the elevated serum alkaline phosphatase activity in biliary obstruction: studies using liver perfusion. Gastroenterology 47: 166 (1964)
89. Shinkai,K., Akedo,H.: A multienzyme complex in serum of hepatic cancer. Cancer Res.32: 2307 (1972)
90. Simpson,R.T., Vallee,B.L., Tait,G.G.: Alkaline phosphatase of Escherichia coli. Composition. Biochemistry 7: 4336 (1968)
91. Simpson,R.T., Vallee,B.L.: Two different classes of metal atoms in alkaline phosphatase of Escherichia coli. Biochemistry 7: 4343 (1968)
92. Smith,I., Perry,J.D., Lightstone,P.J.: Disc electrophoresis of alkaline phosphatase: mobility changes caused by neuraminidase. Clin.Chim.Acta 25: 17 (1969)
93. Statland,B.E., Nishi,H.H., Young,D.S.: Serum alkaline phosphatase: total activity and isoenzyme determination made by use of the centrifugal fast analyzer. Clin.Chem. 18: 1468 (1972)
94. Stolbach,L.L., Krant,M.J., Fishman,W.H.: Intestinal alkaline phosphatase in chylous effusion: role of ABO blood group and secretor status. Enzymologia 42: 431 (1972)
95. Stolbach,L.L., Krant,M.J., Fishman,W.H.: Ectopic production of an alkaline phosphatase isoenzyme in patients with cancer. N.Engl.J.Med.281: 757 (1969)
96. Stolbach,L.L.: Clinical application of alkaline phosphatase isoenzyme analysis. Ann.NY Acad.Sci.166: 760 (1969)
97. Sundblad,L., Wallin-Nilsson,M., Brohult,J.: Characterization of alkaline phosphatase isoenzymes in serum by agar gel electrophoresis. Clin.Chim.Acta 45: 219 (1973)
98. Sussman,H.H., Small,P.A., Cotlove,E.: Human alkaline phosphatase. Immunochemical identification of organ-specific isoenzymes. J.Biol.Chem.243: 160 (1968)

99. Tan,I.K., Chio,L.F., Teow-Suah,L.: Heat stability of human serum alkaline phosphatase in bone and liver diseases. Clin.Chim.Acta 41: 329 (1972)
1oo. Thomas,D.M., Harris,H.: Comparison of thermostabilities of different human placental alkaline phosphatase phenotypes. Ann.Hum.Genet 35: 221 (1971)
1o1. Timperley,W.R.: Alkaline phosphatase secreting tumor of the lung. Lancet 2: 356 (1968)
1o2. Timperley,W.R., Warnes,T.: Alkaline phosphatase in meningiomas. Cancer 26: 1oo (197o)
1o3. Torrianni,A.: Alkaline phosphatase subunits and their dimerization in vivo. J.Bacteriol.96: 12oo (1968)
1o4. Wachstein,M., Meisel,E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH, with special reference to the demonstration of bile canaliculi. Am.J.Clin. Pathol.27: 13 (1957)
1o5. Walker,A.W., Pollard,A.C.: Observation on serum alkaline phosphatase electrophoretic patterns on polyacrylamide gel with particular reference to the effects of butanol extraction. Clin.Chim.Acta 34: 19 (1971)
1o6. Walker,B.A., Eze,L.c., Tweedie,M.C.K., Price Evans,D.A.: The influence of ABO blood groups, secretor status and fat ingestion on serum alkaline phosphatase. Clin.Chim. Acta 35: 433 (1971)
1o7. Warnes,T.W., Timperley,W.R., Hine,P., Kay,G.: Pancreatic alkaline phosphatase and tumor variant. Gut 13: 513 (1972)
1o8. Warnock,M.L., Reisman,R.: Variant alkaline phosphatase in human hepatocellular cancers. Clin.Chim.Acta 24: 5 (1969)
1o9. Warshaw,J.B., Littlefield,J.W., Inglis,N.R., Fishman,W.H. Stolbach,L.L.: Tissue origins of serum alkaline phosphatase in hypophosphatasia. J.Clin.Invest.5o: 2137 (1971)
11o. Watanabe,K., Fishman,W.H.: Application of the stereospecific inhibitor L-phenylalanine to the enzymorphology of intestinal alkaline phosphatase. J.Histochem.Cytochem. 12: 252 (1964)
111. Wilkinson,J.H.: Isoenzymes. Philadelphia, J.B.Lippincott Co., p.1o4 (1966)

112. Winkelman,J., Nadler,S., Demetrious,J., Pileggi,V.J.: The clinical usefulness of alkaline phosphatase determinations. Am.J.Clin.Pathol.57: 625 (1972)

Herrn Professor Dr. med. F.-G. Lehmann danke ich für die Überlassung des Themas.

Frau Marianne Beusch und Frau Ilse Zengel bin ich für ihre Anregungen und Beratung zur Durchführung der laborchemischen Untersuchungen zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 7.4.1948 wurde ich als Sohn des Realschulrektors Walter Zengel und seiner Frau Anneliese, geb. Bätje, in Celle geboren. 1954 wurde ich in die Volksschule I zu Lehrte eingeschult, 1959 an das Gymnasium Lehrte aufgenommen, wo ich am 6.6.1967 das Zeugnis der Reife erwarb.
Vom 1o.6.1967 bis 1o.1o.1968 leistete ich im Brigade-Sanitätsbereich Nienburg-Langendamm meinen Grundwehrdienst ab.
Am 22.1o.1968 nahm ich an der Philipps-Universität Marburg das Studium der allgemeinen Naturwissenschaften (Fachkombination Physik, Chemie, Biologie) auf.
Zum Wintersemester 197o/71 erhielt ich in Marburg meine Zulassung zum Studium der Medizin und legte dort am 26.3.1971 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 5.4.1973 die ärztliche Vorprüfung und am 18.7.1975 die ärztliche Prüfung ab. Vom 1.9.1975 bis 3o.4.1976 war ich an der Medizinischen Universitätsklinik Marburg, vom 1.5. bis 31.8.1976 an der Chirurgischen Abteilung der Städtischen Krankenanstalten Flensburg als Medizinalassistent tätig.
Seit dem 1.1o.1976 bin ich als Arzt an der Abteilung für Innere Medizin der Medizinischen Hochschule Lübeck angestellt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Arndt, Aurich, Bode, Bommer, Büsing, Buchholz, Daume, Dehnicke, Dimroth, Dittrich, Dölle, Eißner, Eschenbach, Exner, Friedrich, Ganz, Gerdes, Graul, Grundner, Hamelmann, Hardewig, Hensel, Hering, Heß, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Jacob, Kaffarnik, Karlson, Klaus, Klein, Kleinsasser, Koch, Koecke, Koransky, Lauer, Linneweh, Lütcke, Mannheim, Maroske, Martini, Nöth, Petry, Pots, Reim, Rodeck, Rohen, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Schultheis, Seidel, Siegert, Thoenes, Uhlarik, Vielhauer, Walcher, Wehrmeyer, Willenbockel.